

Aus der Medizinischen Tierklinik
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

Freies Hämoglobin im Plasma von Pferden

Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von

Win Ohnmar Kyaw

aus Pakokku, Myanmar

Leipzig, 2008

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Arwid Dauschies

Betreuer: Prof. Dr. Gerald Fritz Schusser

Gutachter: Prof. Dr. Gotthold Gäbel,

Veterinär-Physiologisches Institut,

Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Dr. Dipl. ECEIM Wolfgang Scheidemann,

Tierklinik Hochmoor, Gescher-Hochmoor

Prof. Dr. Gerald Fritz Schusser,

Medizinische Tierklinik,

Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Tag der Verteidigung: 25.11.2008

*Diese Arbeit wurde vom DAAD durch
ein Forschungsstipendium unterstützt.*

für meine Eltern und meine Familie

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
1 EINLEITUNG	1
2 ERGEBNISSE	4
2.1 Publikation 1: Spektralphotometrische Bestimmung des freien Hämoglobins im Plasma von gesunden Pferden	4
2.2 Publikation 2: Freies Hämoglobin und Tumor-Nekrose-Faktor- α im Blut von Pferden mit Kolik oder akuter Kolitis	12
2.3 Publikation 3: Klinische und labormedizinische Befunde bei Pferden mit akuter, chronischer oder inapparenter Form der infektiösen Anämie	19
2.4 Publikation 4: Klinik und labormedizinische Befunde bei Pferden mit equiner granulozytärer Ehrlichiose	26
2.5 Publikation 5: Kontinuierlich unkonjugierte Hyperbilirubinämie beim Pferd – Ähnlichkeit mit dem Gilbert-Meulengracht-Syndrom	32
3 DISKUSSION	39
3.1 Entwicklung der Methode zur Bestimmung des fr. Hb und Ermittlung des Referenzbereiches	39
3.2 Fr. Hb und TNF- α bei Pferden mit Kolik und akuter Kolitis	42
3.3 Fr. Hb und equine infektiöse Anämie	46
3.4 Fr. Hb und equine granulozytäre Ehrlichiose	48
3.5 Fr. Hb und Hyperbilirubinämie	48

4	ZUSAMMENFASSUNG	51
5	SUMMARY	53
6	LITERATURVERZEICHNIS	55
	ANHANG	
	DANKSAGUNG	

Abkürzungsverzeichnis

AST	Aspartat-Amino-Transferase
CFU-E	Erythroid Colony Forming Unit
CK	Creatin-Kinase
EIA	Equine infektiöse Anämie
ELISA	Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent Assay
fr. Hb	freies Hämoglobin
γ GT	Gamma-Glutamyl-Transferase
GLDH	Glutamat-Dehydrogenase
Hb-Hp-Clearance	Hämoglobin-Haptoglobin-Clearance
Hb-Hp-Komplex	Hämoglobin-Haptoglobin-Komplex
K	Kalium
K-EDTA	Kalium-Ethylene Diamin Tetra Acetat
LDH	Lactatdehydrogenase
NO	Stickstoffmonoxid
SIRS	systemisch inflammatorisches Responsesyndrom
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha

1 Einleitung

Am Ende des Erythrozytenlebenszykluses werden die Erythrozyten durch Makrophagen phagozytiert und in der Milz und Leber abgebaut. Bei diesem Prozess gelangt kein Hämoglobin in den Blutkreislauf. Somit wird diese Art der Hämolyse auch als extravaskuläre Hämolyse bezeichnet. Dem gegenüber gibt es eine intravaskuläre Hämolyse, die dadurch gekennzeichnet ist, dass Erythrozyten in der Blutbahn lysiert werden. Dabei wird Hämoglobin aus den Erythrozyten freigesetzt. Das freigesetzte Hämoglobin wird als freies Hämoglobin (fr. Hb) bezeichnet. Schätzungen zufolge werden 95% aller Erythrozyten extravaskulär in der Leber und der Milz abgebaut und nur 5% aller Erythrozyten intravaskulär lysiert (DUNCAN et al. 1994; SCHAER et al. 2007). Dieses Gleichgewicht kann durch verschiedene Krankheiten und körpereigene Prozesse gestört werden. Die intravaskuläre Hämolyse tritt verstärkt bei Vaskulitis, disseminierte intravaskuläre Koagulopathie (DIC) und bei physikalischer Gewebeschädigung durch Traumata auf (GOYETTE et al. 2004). Andere Auslöser für eine intravaskuläre Hämolyse sind Schädigungen durch Einwirkung von Oxidantien wie z.B. Vergiftungen mit rotem Ahorn (ALWARD et al. 2006) und osmotische Hämolyse durch Verbrennungen (NORMAN et al. 2005). Bei Pferden kann auch eine leistungsinduzierte intravaskuläre Hämolyse entstehen (MASINI et al. 2003). Die intravaskuläre Hämolyse kann aber auch durch immunbedingte Prozesse ausgelöst werden (RAMAIAH et al. 2003). Auch bei einigen Infektionskrankheiten wie Infektionen mit dem Virus der equinen infektiösen Anämie (EIA) (McGUIRE et al. 1969), mit *Clostridium perfringens* (WEISS u. MORITZ 2003) und mit Leptospiren und Babesien kann eine verstärkte intravaskuläre Hämolyse beobachtet werden. Durch Komplikationen bei Magen-Darm-Krankheiten bei Pferden können größere Mengen Endotoxin freigesetzt werden, das ebenfalls eine intravaskuläre Hämolyse auslösen kann (BARDAKHCH' YAN et al. 1992; LIESE et al. 2001).

Vermehrt freies Hämoglobin, das durch die intravaskuläre Hämolyse entsteht, stimuliert die Produktion von TNF- α *in-vitro* und *in-vivo*, so dass es zu einer hochgradigen systemischen Entzündungsreaktion kommen kann (McFAUL et al. 2000; CARRILLO et al. 2001; LIESE et al. 2001; BORDET et al. 2007). ROTHER et al. (2005) haben festgestellt, dass bei der Konzentration von fr. Hb über 6,21 $\mu\text{mol/l}$ im Plasma eine systemische Entzündungsreaktion beim Menschen möglich ist. Die pathologische Antwort auf diese systemische Entzündungsreaktion wird mit dem Begriff, systemisch-inflammatorisches Responsesyndrom

(SIRS) bezeichnet. Zu der Symptomatik von SIRS gehören Fieber, Hypothermie, Tachypnoe, Tachykardie, Thrombozytopenie, Leukopenie und Leukozytose (BONE et al. 1991). Durch die Stimulation des TNF- α wird der oxidative Stress erhöht. Dadurch werden noch mehr Erythrozyten geschädigt und es wird noch mehr fr. Hb gebildet. Dieser Kreislauf führt zur beschriebenen systemischen Entzündungsreaktion.

Deshalb ist fr. Hb ein wichtiger Parameter für die Diagnose der akuten und chronischen intravaskulären Hämolyse, bei Transfusionsreaktionen, Hämoglobinopathien und Arteriosklerose bei Menschen und Tieren (BADNAR et al. 1994; BUTTARI et al. 2007).

Um die intravaskuläre Hämolyse zu quantifizieren, wird schon seit 60 Jahren an Methoden für die Messung des fr. Hb gearbeitet. In der Humanmedizin stehen verschiedene spektralphotometrische Messmethoden für das fr. Hb im Plasma (FLINK u. WATSON 1942; HARBOE 1959; BLAKNEY u. DINWOODIE 1975; KAHN et al. 1981; BEDNAR et al. 1994) zur Verfügung. Die physiologische Konzentration des fr. Hb beim Menschen liegt bei 0,37-3,17 $\mu\text{mol/l}$ (BADNAR et al. 1994). Zu Beginn dieser Arbeit gab es keine geeignete Methode für die Bestimmung des fr. Hb bei Pferden.

Durch die Messung des fr. Hb wird es möglich, eine *in-vitro* induzierte Hämolyse festzustellen. Eine verstärkte Hämolyse kann zudem zu falschen Ergebnissen bei der Messung verschiedener klinisch-chemischer Parameter im Plasma oder Serum führen, das sind K, LDH, AST und CK (FRANK et al. 1978).

Die vorliegende Arbeit wird aufgrund der wissenschaftlichen Fragestellung in drei Teilen geteilt.

Im ersten Teil der Arbeit soll, das freie Hämoglobin im Plasma mit einer schnellen, einfachen und exakten Methode nachgewiesen, und der Referenzbereich der fr. Hb-Konzentration bei gesunden Pferden bestimmt werden.

Die Erhöhung der Konzentration an fr. Hb bei verschiedenen Kolikformen war Gegenstand des zweiten Teils der Arbeit. Außerdem sollte der Zusammenhang zwischen fr. Hb und dem proinflammatorischen Zytokin TNF- α untersucht werden.

Der dritte Teil der Studie soll zeigen, dass fr. Hb ein wichtiger Parameter für die Feststellung der intravaskulären Hämolyse bei equiner infektiösen Anämie, equiner granulozytärer Ehrlichiose, die heute als equine Anaplasmosen bezeichnet wird, und bei unkonjugierter Hyperbilirubinämie ist.

2 Ergebnisse

2.1 Publikation 1: Spektralphotometrische Bestimmung des freien Hämoglobins im Plasma von gesunden Pferden

Publiziert in Tierärztl Prax. 2007; 35(G): 432-8.

Spektralphotometrische Bestimmung des freien Hämoglobins im Plasma von gesunden Pferden

W. Ohnmar Kyaw, A. Uhlig, A. Grosche, T. Wittek, A. Meister, G. F. Schusser

Aus der Medizinischen Tierklinik (Direktor: Prof. Dr. Dipl. ECEIM G. F. Schusser), Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Schlüsselwörter:

Anämie, Hyperbilirubinämie, intravasale Hämolyse

Zusammenfassung:

Gegenstand und Ziel: Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung zweier spektralphotometrischer Methoden zur Messung des freien Hämoglobins (fr. Hb) (Methoden nach Harboe und Kahn) auf ihre Eignung beim Pferd und die Bestimmung des Referenzwerts des fr. Hb im Plasma von Pferden. **Material und Methoden:** Von 188 klinisch gesunden Pferden unterschiedlichen Geschlechts und Alters wurde heparinisiertes Blutplasma mittels UV/Vis-Spektralphotometer Beckman-Coulter DU 640 B unter Verwendung von Halbmikro-Einmalküvetten auf fr. Hb untersucht. Eine sorgfältige Punktion der V. jugularis externa und seitliches Hineinfließen in ein Lithiumheparinröhrchen verhindert die iatrogene Hämolyse. Die gewonnenen heparinisierten Blutproben müssen nach der Entnahme 30 Minuten bei Zimmertemperatur stehen. Der Plasmaüberstand wird danach fünf Minuten bei 1100 g zentrifugiert. Als die spektrale Absorption beeinflussende Faktoren wurden Pferdehymoglobin aus dem Skelettmuskel, Bilirubin-Isomere und ein hyperlipämisches Serum eingesetzt. **Ergebnisse:** Der Vergleich beider Bestimmungsmethoden zeigt, dass sich die Methode nach Kahn für das Pferd eignet. Die zentrifugierten Heparinplasma-Proben können ohne Beeinflussung des Messergebnisses zwei Tage bei 4 °C gelagert werden. Eine Lagerung der Plasma-Proben bei -20 °C für drei Monate ist ebenfalls möglich. Zwischen 0,21 und 105 µmol/l besteht eine Linearität der Konzentration des fr. Hb. Das Messergebnis wird durch Myoglobin (bis 176 µmol/l), Bilirubin (bis 152,7 µmol/l) und hyperlipämisches Serum (Triglyzeride bis 5,71 mmol/l) nicht beeinflusst. Der Referenzbereich für fr. Hb im Plasma adulter, gesunder Pferde liegt im Bereich zwischen 0,09 und 2,01 µmol/l (95%-Konfidenzintervall) bei einem Median von 0,80 µmol/l. **Schlussfolgerung und klinische Relevanz:** Die Methode nach Kahn erwies sich für das Pferd als geeignet. Freies Hämoglobin ist ein Parameter für die Diagnose intravaskulärer Hämolyse als Folge einer Septikämie, Endotoxämie oder nach Bluttransfusion, wobei der Referenzbereich für fr. Hb im Plasma adulter, gesunder Pferde zwischen 0,09 und 2,01 µmol/l liegt.

Key words:

Anemia, hyperbilirubinemia, intravascular haemolysis

Summary:

Objective: This study was aimed to evaluate a suitable method for free haemoglobin (fr. Hb) measurement in plasma of horses using as references two simple spectrophotometric methods from human medicine (method of Kahn and Harboe) and to determine normal reference value of plasma fr. Hb in horses. **Material and methods:** The study included 188 healthy horses of different age and sex. UV/Vis-Spectrophotometer Beckman-Coulter DU 640 B and half micro single-use cuvettes were used for measurement of fr. Hb. Blood was collected from the V. jugularis externa and drawn into the wall of the lithium-heparinized blood collecting tube to avoid in-vitro haemolysis. After standing of heparinized plasma samples for 30 minutes at room temperature, supernatant plasma was centrifuged at 1,100 g for five minutes. To determine the influence of spectral absorption, equine myoglobin from skeletal muscle, bilirubin-isomers and hyperlipemic serum were used. **Results:** The method of Kahn is suitable for use in equine medicine. The centrifuged plasma samples can be stored at refrigerated temperature (4 °C) for two days and at -20 °C for three months. To analyse the characteristics of the method and comparison of the methods, linearity, accuracy of the method and influence of risk factors were examined. There is linearity of fr. Hb concentration from 0.21 to 105 µmol/l. No influence of bilirubin (up to 152.7 µmol/l), myoglobin (up to 176 µmol/l) and lipemic serum (triglyceride up to 5.71 mmol/l) was detected in this measurement. Physiological reference value of fr. Hb in plasma of adult healthy horses is between 0.09 and 2.01 µmol/l (95% confidence interval) with the median of 0.80 µmol/l. **Conclusion and clinical relevance:** The method of Kahn is a suitable method for the measurement of fr. Hb in equine medicine. Fr. Hb is a valuable parameter for the diagnosis of intravascular haemolysis due to endotoxaemia, septicaemia and blood transfusion. The reference range in plasma of adult healthy horses is 0.09–2.01 µmol/l.

Spectrophotometric measurement of free haemoglobin in plasma of healthy horses

Tierärztl Prax 2007; 35 (G): 432-438

Einleitung

Laut Literatur stammt das freie Hämoglobin (fr. Hb) im Plasma gesunder Pferde aus der Hämolyse alternder Erythrozyten, die zu 5% intravaskulär stattfindet (5). Freies Hämoglobin ist ein wichtiger Parameter zur Erfassung akuter oder chronischer intravaskulärer Hämolysen, die unter anderem bei hämolytischen Anämien, Transfusionsreaktionen, hochgradigen Verbrennungen der Haut und bei Hämoglobinopathien auftreten können (1, 9, 10, 16, 19). Kommt es zur intravasalen Hämolyse, erhöht sich die Konzentration von Hämoglobin im Plasma, wo es frei als Dimer von α - und β -Ketten vorliegt.

Im Fall einer geringgradigen Hämolyse kann freies Hämoglobin vollständig an Haptoglobin gebunden werden. In der Leber erfolgt der Abbau des Hämoglobin-Haptoglobin-Komplexes (4, 5, 11, 14). Übersteigt die Konzentration des fr. Hb im Plasma die hämoglobinbindende Kapazität des Haptoglobins, geht das Hämoglobin als freies Protein in den Kreislauf über (4). Erst bei Konzentrationen des fr. Hb über 20 $\mu\text{mol/l}$ zeigt sich eine geringgradige Rosafärbung des Plasmas, sodass die Plasmafärbung erst bei sehr starker Hämolyse für die Diagnose nutzbar ist. Manifestiert sich die Hämolyse klinisch, lässt sich nach 12 bis 24 Stunden das Symptom der Hämoglobinurie beobachten (5). Allerdings kann bereits eine subklinische Hämolyse zu erhöhten Hämoglobinkonzentrationen im Kreislauf führen und Schädigungen der Nieren- und Leberfunktion sowie Schock und Infarkte über eine disseminierte intravasale Koagulopathie bedingen (12, 15). Zur frühzeitigen Diagnostik empfiehlt es sich, schon bei Verdacht auf hämolytische Vorgänge das fr. Hb im Plasma zu messen (2). Haptoglobin ist als ein Marker der Hämolyse nur bedingt geeignet, da es bei Lebererkrankungen oder bei Akute-Phase-Reaktionen nicht den Grad der Hämolyse reflektieren kann (12).

Weiterhin wird es durch die Messung des fr. Hb möglich, eine *in vitro* induzierte Hämolyse festzustellen. Eine verstärkte Hämolyse kann zudem falsche Ergebnisse bei der Messung verschiedener klinisch-chemischer Parameter im Plasma oder Serum (z. B. Elektrolyte, LDH, AST, CK) bedingen (7).

In der Humanmedizin stehen verschiedene spektralphotometrische Messmethoden für das fr. Hb im Plasma (1, 2, 6, 8, 10) zur Verfügung, wobei unterschiedliche Wellenlängen genutzt werden, um Störungen durch Bilirubin (17), Myoglobin und Triglyzeride zu minimieren. Im Allgemeinen wird in der Humanmedizin die Methode nach Harboe (8) verwendet. Der Nachteil dieser Methode besteht in der Beeinflussung durch erhöhte Bilirubinkonzentrationen. Bei der Methode nach Kahn (10) mit einer Absorptionsmessung bei 578 nm besteht dieser Nachteil nicht (1, 10).

In der vorliegenden Untersuchung wurden die arbeitstechnisch einfachen Methoden nach Harboe (8) und Kahn (10) angewendet, um ihre Eignung zur Bestimmung des fr. Hb im Plasma von Pferden zu untersuchen. Weiterhin sollte geprüft werden, inwiefern unterschiedliche Entnahmetechniken, verschiedene Antikoagulanzen, die Art und Weise der Zentrifugation, die Probenlagerung und mögliche Störfaktoren wie erhöhte Konzentrationen an Myoglobin, Bilirubin und Triglyzeriden das Messergebnis

beeinflussen. Letztendlich bestand die Zielstellung in der Ermittlung eines Referenzwertes für fr. Hb beim Pferd.

Material und Methoden

Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte aus der V. jugularis externa mittels einer 18-G-Einmalkanüle und einer 5-ml-Einwegspritze, wobei Blut direkt in der 5-ml-Einwegspritze gesammelt und anschließend in das Lithiumheparinröhrchen (Fa. Kabe Labortechnik GmbH, Nümbrecht-Elsenroth) gegeben wurde. Weiterhin wurde Blut direkt von der Einmalkanüle in Lithiumheparin- und EDTA-Röhrchen durch seitliches Einfließen gesammelt.

Probenbearbeitung

Die Blutproben der gesunden Pferde wurden 30 Minuten bei Zimmertemperatur gelagert und der Plasmaüberstand danach bei 1100 g für fünf Minuten zentrifugiert. Die spektralphotometrischen Messungen des fr. Hb erfolgten nach den Methoden nach Kahn (10) und Harboe (8) am UV/Vis Spektralphotometer DU 640 B (Fa. Beckman-Coulter GmbH, Krefeld) unter Nutzung von Halbmikro-Einmalküvetten (Fa. Ratiolab GmbH, Dreieich).

Hämoglobin-Standardlösung

Zur Herstellung einer Hämoglobin-Standardlösung wurde eine heparinisierte Blutprobe von einem gesunden Pferd entnommen und die Gesamtkonzentration an Hämoglobin mit dem hämatologischen Messsystem ADVIA® 120 (Fa. Bayer Diagnostics, Fernwald) bestimmt. Eine weitere heparinisierte Blutprobe (4 ml) des selben Pferdes wurde anschließend zentrifugiert, das Plasma entfernt und die sedimentierten Erythrozyten in 1,5 ml isotoner NaCl-Lösung dreimal gewaschen. Ein Milliliter Erythrozytensediment wurde mit 9 ml kaltem (4 °C) destilliertem Wasser durchmischt, um eine vollständige Hämolyse zu erzielen. Nach Zentrifugation bei 1800 g für 10 Minuten zur Abtrennung der festen Zellbestandteile ergab sich eine Hb-Standardlösung bekannter Konzentration. Hb-Standardlösungen wurden jeden Tag frisch hergestellt. Zur Herstellung von Verdünnungen der Standardlösung diente isotone NaCl-Lösung.

Methodenvergleich

Die Methode nach Harboe nutzt das Absorptionsmaximum des Hämoglobins bei 415 nm (Soretbande). Durch Messung der Absorptionen bei 380 nm und 450 nm und Anwendung eines mathematischen Korrekturverfahrens werden Störungen und Plasmatrübungen berücksichtigt (8). Aufgrund der starken Absorption bei 415 nm ist eine Verdünnung der Plasmaproben mit 0,01% Na_2CO_3 -Lösung (1 + 10) notwendig.

Die Methode nach Kahn nutzt eine schwächere, aber spezifische Absorptionsbande bei 578 nm (10). Somit können die Plasmaproben ohne Verdünnung gemessen werden. Das Hintergrundrauschen wird durch zusätzliche Messungen bei den Wellenlängen 562 nm und 598 nm mittels eines mathematischen Korrekturverfahrens nach Blakney (2) und Bednar (1) eliminiert.

Prüfung von Einflussfaktoren

Die untersuchten Einflussfaktoren auf die Konzentration des fr. Hb im Blutplasma von je 20 gesunden Pferden waren Entnahmetechnik, EDTA und Heparin als Antikoagulanzen, Zentrifugation und Probenlagerung. Kontrolliert wurde ferner die Störung der spektralen Absorption durch Pferdemoglobin aus dem Skelettmuskel (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München), Bilirubin-Isomere (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) oder lipämisches Serum.

Hb-Konzentration der Standardlösung* und der Verdünnungen μmol/l	Methode nach Kahn: gemessene Hb-Konzentration, 10-fach-Bestimmungen			Methode nach Harboe: gemessene Hb-Konzentration, 10-fach-Bestimmungen		
	$\bar{x} \pm SD$ μmol/l	VK %	W %	$\bar{x} \pm SD$ μmol/l	VK %	W %
210*	124,75 ± 12,36	9,91	59,4	83,64 ± 12,49	14,93	39,8
105	99,67 ± 0,74	0,74	94,9	332,52 ± 32,90	9,92	316,7
52,5	51,98 ± 0,25	0,47	99,0	334,40 ± 19,90	5,95	636,9
21,0	19,64 ± 0,53	2,72	93,5	237,58 ± 44,70	18,82	1131,3
2,10	1,99 ± 0,008	0,40	94,8	10,09 ± 0,95	9,38	480,5
0,21	0,19 ± 0,013	7,35	90,5	6,05 ± 0,80	13,29	2880,9

Tab. 1

Methodenvergleich nach Kahn und Harboe zur Bestimmung des freien Hämoglobins in einer Standardlösung und in den Verdünnungen anhand von 10-fach-Messungen. Der erhöhte Variationskoeffizient (VK) und die falsche Wiederfindungsrate (W) mit der Methode nach Harboe werden hier ersichtlich.

Bilirubinpulver wurde abgewogen und in einer Pferdeserumprobe gelöst. Im Serum wurden die vorhandenen Konzentrationen von Bilirubin und fr. Hb gemessen, bevor die Zugabe von Bilirubin erfolgte. Die ermittelte Bilirubinkonzentration und das hinzugefügte Bilirubin wurden als Gesamtbilirubin berechnet. Nach Mischung der Hb-Standardlösung und der so mit Bilirubin angereicherten Pferdeserumprobe im Verhältnis 1 : 1 wurde das fr. Hb gemessen. Myoglobinpulver wurde in der Hb-Standardlösung gelöst und das fr. Hb gemessen. Lipämisches Serum eines Ponys und die Hb-Standardlösung wurden 1 : 1 gemischt und wieder das fr. Hb gemessen. Hb-Standardlösungen mit verschiedenen Konzentrationen an fr. Hb wurden verdünnt, mit bestimmten Konzentrationen an Myoglobin und Bilirubin oder lipämischem Serum kombiniert und mittels 10-fach-Bestimmung auf fr. Hb getestet. Die Wiederfindungsrate wurde abzüglich des nachgewiesenen fr. Hb im verwendeten Serum berechnet.

Tiergut

Für die Bestimmung der Richt- und Referenzwerte erfolgte die Entnahme von Blutproben, gesammelt in Lithiumheparinröhrchen, bei 188 Pferden unterschiedlichen Geschlechts und Alters: 21 Pferde (drei Warmblutpferde, 18 Haflinger) im Alter von einer Woche bis zu zwei Monaten, 16 Warmblutpferde im Alter von ein bis zwei Jahren und 151 Pferde im Alter von drei Jahren und darüber (134 Warmblutpferde, acht Ponys, sechs Kaltblutpferde und drei Haflinger). Neben einer klinischen Untersuchung der Pferde wurden hämatologische Para-

meter im EDTA-Blut (Blutbild) und klinisch-chemische Parameter im Serum (Gesamteiweiß, Albumin, Gesamtbilirubin, direktes und indirektes Bilirubin, Harnstoff, Kreatinin, Glukose, Triglyzeride, alkalische Phosphatase, AST, GGT, GLDH, LDH, CK) bestimmt. Dabei bewegten sich alle Parameter im physiologischen Bereich und die Tiere wurden als klinisch gesund befundet.

Biostatistische Auswertung

Die statistische Auswertung der vorliegenden Ergebnisse erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS 14.0. Zur Prüfung auf Normalverteilung diente der Kolmogorov-Smirnov-Test. Als statistische Lageparameter für die einzelnen Gruppen wurden das arithmetische Mittel und die Standardabweichung berechnet. Bei den 10-fach-Bestimmungen erfolgte die Berechnung des Variationskoeffizienten und der Wiederfindungsrate. Für die Vergleiche zwischen mehr als zwei unabhängigen Stichproben kam die Varianzanalyse und, wenn angebracht, der Bonferroni-Test als Post-Hoc-Test sowie bei Vergleichen zwischen zwei Gruppen der Student-T-Test zur Anwendung. P-Werte < 0,05 wurden als kennzeichnend für statistisch signifikante Unterschiede betrachtet. Die Richt- bzw. Referenzwertberechnung erfolgte mittels Berechnung des Medianwerts und des 95%-Konfidenzintervalls (18).

Ergebnisse

Die mit der Methode nach Harboe gemessenen Konzentrationen an fr. Hb der Standardlösung und der Verdünnungen wichen extrem von den tatsächlich vorliegenden Konzentrationen ab (Tab. 1). Außer in der Standardlösung wurden in den Verdünnungen vielfach überhöhte Konzentrationen bestimmt, was sich in einer Wiederfindungsrate von 316,7–2880,9% niederschlägt. Im Gegensatz dazu liefert die Methode nach Kahn in den Verdünnungen der Standardlösung reproduzierbare Ergebnisse, die Wiederfindungsraten von 90,5–99,0% zur Folge haben. Lediglich in der Standardlösung mit 210 μmol/l fr. Hb lag die Wiederfindungsrate nur bei 59,4%. Der Variationskoeffizient der 10-fach-Bestimmungen der Verdünnungen spricht für die Genauigkeit dieser Messmethode. Die Linearität zwischen den Verdünnungsstufen der Standardlösung und den tatsächlich gemessenen Konzentrationen an fr. Hb ist in Abbildung 1 dargestellt.

Verschiedene Blutentnahmetechniken (Tab. 2) hatten keinen statistisch gesicherten Einfluss auf die Konzentration an fr. Hb im Plasma, obwohl die Konzentration an fr. Hb im direkt aufgefangenen Blut mit $0,53 \pm 0,44$ μmol/l gegenüber der Probe bei Blut-

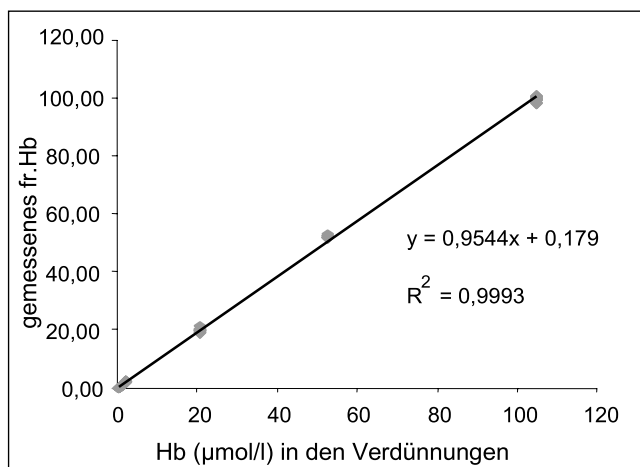


Abb. 1 Linearität zwischen den Verdünnungsstufen der Hb-Standardlösung und den tatsächlich gemessenen Konzentrationen an freiem Hämoglobin mit der Methode nach Kahn

Tab. 2 Die Blutentnahmetechniken zeigen statistisch keinen Unterschied ($p > 0,05$) in der Konzentration an freiem Hämoglobin im Plasma (Methode nach Kahn, Varianzanalyse, \bar{x} = arithmetisches Mittel, SD = Standardabweichung).

Art der Blutentnahme	n	Freies Hb ($\mu\text{mol/l}$) $\bar{x} \pm \text{SD}$	Signifikanz mit $p < 0,05$
direkt aufgefangenes Blut	20	$0,53 \pm 0,44$	n. s.
mittels Einwegspritze	20	$0,95 \pm 0,88$	n. s.
mittels Einwegspritze und aufgesetzter Kanüle	20	$1,10 \pm 0,99$	n. s.

entnahme mittels Einwegspritze und aufgesetzter Kanüle mit $1,10 \pm 0,99 \mu\text{mol/l}$ deutlich niedriger ausfiel.

Die Konzentration an fr. Hb war im Heparinblutplasma mit $0,73 \pm 0,52 \mu\text{mol/l}$ im Vergleich zum EDTA-Blutplasma mit $1,97 \pm 0,90 \mu\text{mol/l}$ signifikant niedriger (Tab. 3). In Blutproben, die 30 Minuten nach Entnahme zentrifugiert wurden, ergab sich eine signifikant geringere Konzentration ($1,06 \pm 1,02 \mu\text{mol/l}$) als in sofort zentrifugierten Blutproben ($2,09 \pm 1,36 \mu\text{mol/l}$) (Tab. 3). Der Vergleich zwischen den Konzentrationen an fr. Hb von heparinisierten Plasmaproben, die sofort nach der Blutentnahme oder nach einer Lagerung bei 4°C über 24 und 48 Stunden oder bei

Tab. 3 Die Konzentration an fr. Hb ist in EDTA-Blutplasma und in sofort nach der Blutentnahme zentrifugierten Blutproben signifikant höher ($* = p < 0,05$) als in Heparinblutplasma und in Blutproben, die 30 Minuten nach der Entnahme zentrifugiert wurden (Methode nach Kahn, T-Test, \bar{x} = arithmetisches Mittel, SD = Standardabweichung).

Antikoagulans	n	Freies Hb ($\mu\text{mol/l}$) $\bar{x} \pm \text{SD}$	Zentrifugation der Heparinblutproben	n	Freies Hb ($\mu\text{mol/l}$) $\bar{x} \pm \text{SD}$
EDTA	20	$1,97 \pm 0,90^*$	direkt nach Entnahme	20	$2,09 \pm 1,36^*$
Heparin	20	$0,73 \pm 0,52^*$	nur Überstand nach 30 min	20	$1,06 \pm 1,02^*$

Tab. 4 Die Konzentrationen an fr. Hb, gemessen sofort nach der Blutentnahme oder nach Lagerung bei unterschiedlichen Temperaturen, differierten nicht signifikant (Methode nach Kahn, Varianzanalyse, $p > 0,05$, \bar{x} = arithmetisches Mittel, SD = Standardabweichung).

Heparinplasma	n	Freies Hb ($\mu\text{mol/l}$) $\bar{x} \pm \text{SD}$	Heparinplasma	n	Freies Hb ($\mu\text{mol/l}$) $\bar{x} \pm \text{SD}$
nach Entnahme	20	$1,90 \pm 1,55$	nach Entnahme	20	$1,35 \pm 0,76$
Lagerung bei 4°C , 24 Stunden	20	$1,87 \pm 1,48$	Lagerung bei -20°C über 3 Monate	20	$1,33 \pm 0,79$
Lagerung bei 4°C , 48 Stunden	20	$1,90 \pm 1,39$			

Tab. 5 Alle vier Bilirubinkonzentrationen beeinflussen die spektrale Absorption und reduzieren die Wiederfindung des fr. Hb in der Standardlösung und den Verdünnungen signifikant ($p < 0,05$) (Methode nach Kahn, Bonferroni-Test, \bar{x} = arithmetisches Mittel, SD = Standardabweichung, VK = Variationskoeffizient, W = Wiederfindungsrate).

Konzentration an fr. Hb ($\mu\text{mol/l}$)	Gemessene Konzentrationen an freiem Hämoglobin ($\mu\text{mol/l}$) nach Zusatz unterschiedlicher Bilirubinkonzentrationen											
	22,2 μmol Bilirubin/l als Zusatz			41,9 μmol Bilirubin/l als Zusatz			84,2 μmol Bilirubin/l als Zusatz			152,7 μmol Bilirubin/l als Zusatz		
	$\bar{x} \pm \text{SD}$	VK (%)	W (%)	$\bar{x} \pm \text{SD}$	VK (%)	W (%)	$\bar{x} \pm \text{SD}$	VK (%)	W (%)	$\bar{x} \pm \text{SD}$	VK (%)	W (%)
125,0 Standardlösung	$119,04 \pm 0,05$	0,04	95,2	$119,97 \pm 0,10$	0,08	96,0	$119,04 \pm 0,04$	0,04	95,2	$118,38 \pm 0,32$	0,27	94,7
73,1 Verdünnung	$67,16 \pm 0,11$	0,17	91,9	$68,92 \pm 0,13$	0,19	94,3	$66,97 \pm 0,03$	0,05	91,6	$65,94 \pm 0,07$	0,11	90,2
37,7 Verdünnung	$34,81 \pm 0,39$	1,14	92,3	$34,02 \pm 0,08$	0,25	90,2	$34,29 \pm 0,14$	0,40	91,0	$34,16 \pm 0,06$	0,18	90,6
19,7 Verdünnung	$18,18 \pm 0,37$	2,06	92,3	$18,75 \pm 0,15$	0,81	95,2	$17,86 \pm 0,03$	0,17	90,7	$17,79 \pm 0,04$	0,20	90,3
9,95 Verdünnung	$8,96 \pm 0,16$	1,79	90,1	$9,04 \pm 0,005$	0,05	90,0	$9,09 \pm 0,12$	1,28	91,4	$9,15 \pm 0,02$	0,25	92,0
4,99 Verdünnung	$4,57 \pm 0,06$	1,43	91,6	$4,49 \pm 0,42$	0,42	90,0	$4,71 \pm 0,02$	0,51	94,4	$4,50 \pm 0,03$	0,71	90,2

Tab. 6 Alle drei Myoglobinkonzentrationen beeinflussen die spektrale Absorption und reduzieren die Wiederfindung des fr. Hb in der Standardlösung und der Verdünnung signifikant (* = $p < 0,05$) (Methode nach Kahn, Bonferroni-Test, \bar{x} = arithmetisches Mittel, SD = Standardabweichung, VK = Variationskoeffizient, W = Wiederfindungsrate).

	Gemessene Konzentrationen an freiem Hämoglobin ($\mu\text{mol/l}$) nach Zusatz unterschiedlicher Myoglobinkonzentrationen								
Konzentration an fr. Hb ($\mu\text{mol/l}$)	58,5 μmol Myoglobin/l als Zusatz			117,0 μmol Myoglobin/l als Zusatz			176,0 μmol Myoglobin/l als Zusatz		
	$\bar{x} \pm \text{SD}$	VK (%)	W (%)	$\bar{x} \pm \text{SD}$	VK (%)	W (%)	$\bar{x} \pm \text{SD}$	VK (%)	W (%)
90,0* Standardlösung	88,33 \pm 0,07*	0,08	98,1	89,55 \pm 0,03*	0,04	99,5	88,52 \pm 0,03*	0,03	98,4
1,04* Verdünnung	1,00 \pm 0,01*	0,80	96,2	1,00 \pm 0,01*	0,92	96,2	1,00 \pm 0,01*	0,83	96,2

Tab. 7 Eine Triglyzeridkonzentration von 5,71 mmol/l reduziert die spektrale Absorption des fr. Hb nicht signifikant ($p > 0,05$) (Methode nach Kahn, Bonferroni-Test, \bar{x} = arithmetisches Mittel, SD = Standardabweichung, VK = Variationskoeffizient, W = Wiederfindungsrate).

	Gemessene Konzentrationen an freiem Hämoglobin ($\mu\text{mol/l}$) nach Zusatz von 5,71 mmol Triglyzeriden/l		
Konzentration an fr. Hb ($\mu\text{mol/l}$)	$\bar{x} \pm \text{SD}$	VK (%)	W (%)
126,18 Standardlösung	116,59 \pm 0,05	0,04	92,4
79,32 Verdünnung	74,49 \pm 0,10	0,14	93,9
40,57 Verdünnung	36,71 \pm 0,02	0,06	90,5
19,84 Verdünnung	18,39 \pm 0,09	0,49	92,7
10,10 Verdünnung	9,03 \pm 0,006	0,07	89,4
4,99 Verdünnung	4,65 \pm 0,14	2,92	93,2

–20 °C über drei Monate gemessen wurden, zeigte keinen signifikanten Unterschied (Tab. 4).

Bilirubin, geprüft in vier unterschiedlichen Konzentrationen, beeinflusste die spektrale Absorption und reduzierte somit die Wiederfindung des fr. Hb in der Standardlösung und in den Ver-

dünnungen signifikant. Die Wiederfindungsrate betrug aber dennoch mehr als 90%. Der Variationskoeffizient der 10-fach-Messungen lag in allen Bestimmungen unter 2,07% (Tab. 5).

Der Zusatz von Myoglobin verursachte signifikant niedrigere Messergebnisse an fr. Hb im Vergleich zur Standardlösung und zu den Verdünnungen. Die Wiederfindungsrate bewegte sich jedoch in allen Messreihen über 96% und war damit im Vergleich zum Bilirubin deutlich höher. Der Variationskoeffizient der 10-fach-Bestimmungen lag in allen Fällen unter 1% (Tab. 6).

Eine Triglyzeridkonzentration von 5,71 mmol/l hatte einen reduzierenden, nicht signifikanten Einfluss auf die Konzentration von fr. Hb in der Standardlösung und in den Verdünnungen. So bewirkte eine Triglyzeridkonzentration von 5,71 mmol/l niedrigere Messwerte im Vergleich zur Ausgangssituation. Die Wiederfindungsrate variierte zwischen 89,4 und 93,9%. Der Variationskoeffizient der 10-fach-Bestimmungen blieb in allen Fällen unter 3% (Tab. 7).

Der Referenzbereich des fr. Hb bei dreijährigen und älteren Pferden lag bei einem Konfidenzintervall von 95% zwischen 0,09 und 2,01 $\mu\text{mol/l}$ bei einem Median von 0,80 $\mu\text{mol/l}$. Eine Woche bis zu zwei Monate alte Fohlen hatten einen Richtwert von 0,11–2,05 $\mu\text{mol/l}$ mit einem Median von 1,11 $\mu\text{mol/l}$. Ein bis zwei Jahre alte Jährlinge besaßen einen Richtwert von 0,19 bis 2,57 $\mu\text{mol/l}$ mit einem Median von 0,70 $\mu\text{mol/l}$ (Tab. 8).

Tab. 8 Referenzbereich und Richtwerte für freies Hämoglobin bei gesunden erwachsenen Pferden, Fohlen und Jährlingen

Alter der Pferde	Anzahl (n)	Rasseverteilung	Richtwerte ($\mu\text{mol/l}$)	Median ($\mu\text{mol/l}$)	Konfidenzintervall ($\mu\text{mol/l}$)	
					2,5%	97,5%
1 Woche bis 2 Monate	21	3 Warmblutpferde 18 Haflinger	0,11–2,05	1,11	–	–
1 bis 2 Jahre	16	16 Warmblutpferde	0,19–2,57	0,70	–	–
3 Jahre und älter (Referenzbereich)	151	134 Warmblutpferde 6 Kaltblutpferde 8 Ponys 3 Haflinger	–	0,80	0,09	2,01

Diskussion

Zur Charakterisierung einer geeigneten Methode, um fr. Hb im Plasma von Pferden zu messen, wurden verschiedene Einflussfaktoren untersucht. Von Interesse waren dabei die analytische Charakterisierung der Messmethode (Messwellenlänge, Richtigkeit, Präzision, Linearität, Nachweisvermögen), Aspekte der Blutentnahme, Probenvorbereitung (Auswahl der Antikoagulantien, Zentrifugation, Temperatur und Lagerung der Proben) und die Beeinflussung der Bestimmung durch mögliche Störfaktoren wie erhöhte Bilirubin-, Myoglobin- oder Triglyzeridkonzentrationen.

Die spektralphotometrischen Methoden nach Harboe und Kahn wurden auf ihre Eignung zur Bestimmung des freien Hämoglobins im Pferdeplasma untersucht. Die in der Humanmedizin bevorzugt angewendete Methode nach Harboe (8) mit einer Messwellenlänge von 415 nm erfüllt die Anforderungen beim Pferd bezüglich Richtigkeit der Messungen und Wiederholbarkeit nicht. Die Störungen durch Bilirubin und andere Hämipigmente werden nicht eliminiert (8). Die spektralphotometrische Messung bei 578 nm (Methode nach Kahn, [10]) ist dagegen spezifisch und liefert nachvollziehbare Ergebnisse. Die Absorption des Oxyhämoglobins bei 578 nm ist proportional zur Konzentration des Hämoglobins und wird durch Bilirubin und andere Hämipigmente aufgrund der im Wellenlängenbereich von 562–598 nm erfolgenden Untergrundkorrektur nicht beeinflusst (1, 10). Der lineare Bereich der Methode erstreckt sich von 0,21 bis 105 μmol Hämoglobin/l. Höhere Hb-Konzentrationen erfordern somit eine Verdünnung der Plasmaproben.

Eine sorgfältige Blutentnahme und Bearbeitung der Proben sind eine entscheidende Voraussetzung zur exakten quantitativen Messung des fr. Hb, da eine erhöhte Konzentration an fr. Hb, bedingt durch in vitro Hämolyse, ausgeschlossen werden muss. Obwohl die drei untersuchten Entnahmetechniken sich vom Messergebnis her nicht signifikant unterscheiden, erwies sich die Befüllung des Probengefäßes direkt aus der Kanüle als am besten geeignet, wobei das Blut an der Gefäßwand entlanglaufen sollte.

Der Vergleich von Heparin und EDTA als Antikoagulantien ergab, dass Heparinplasmaproben besser zur Bestimmung des fr. Hb geeignet sind als EDTA-Plasmaproben. Der unterschiedliche Mechanismus der Antikoagulantienwirkung (Heparin verhindert die Prothrombinbildung, EDTA bindet Kalzium) verursacht offenbar im Fall von EDTA eine geringfügig stärkere In-vitro-Hämolyse. Die häufig in Heparinröhrchen vorhandenen Kugeln zur besseren Abtrennung des Plasmas nach Zentrifugation erwiesen sich durch die stärkere mechanische Beeinflussung der Erythrozyten als ungeeignet. Es sollten deshalb kommerziell erhältliche Lithiumheparinröhrchen ohne Kugeln verwendet werden.

Experimentell konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass die direkte Zentrifugation der Heparinblutproben die Messung des fr. Hb stärker beeinflusst als eine nach Absinken der meisten Zellen erfolgende Zentrifugation des Überstands. Die Blutproben sollten deshalb nach der Entnahme 30 Minuten bei Zimmertemperatur stehend gelagert werden, um danach nur den Überstand

bei 1100 g für fünf Minuten zu zentrifugieren. Heparinplasmaproben können ohne Beeinflussung der Messung des fr. Hb bis 48 Stunden im Kühlschrank bei 4 °C gelagert werden. Ein Einfrieren der Proben und die Lagerung bei minus 20 °C für maximal drei Monate sind ebenfalls möglich.

Bilirubin ist ein Hauptstörfaktor (1) für die Messung des fr. Hb im Plasma, da es im verwendeten Wellenlängenbereich ebenfalls absorbieren kann. Bei Pferden mit erhöhter intravasaler Hämolyse sind hohe Bilirubinkonzentrationen zu erwarten, sodass eine mögliche Beeinträchtigung der Hb-Messung durch Bilirubinkonzentrationen über dem Referenzbereich von bis zu 45 $\mu\text{mol/l}$ zu erwarten wäre. Um dies zu prüfen, wurden Plasmaproben mit unterschiedlichen Konzentrationen an fr. Hb und Bilirubin hergestellt und die Messung des fr. Hb durchgeführt. Die Bilirubinkonzentrationen reichten dabei von physiologischen (22,2 $\mu\text{mol/l}$) bis zu pathologischen Werten (152,7 $\mu\text{mol/l}$). Es zeigte sich, dass die Messung des fr. Hb im Plasma durch Bilirubinkonzentrationen in diesen Bereichen nicht wesentlich beeinflusst wird. Bei höheren Bilirubinkonzentrationen sollten die Plasmaproben so verdünnt werden, dass die Bilirubinkonzentration unter 152,7 $\mu\text{mol/l}$ liegt (17).

Myoglobin erreicht im Plasma nur selten Konzentrationen, die hoch genug sind, um eine erkennbare Färbung des Plasmas zu verursachen. Myoglobin wird sehr schnell über die Niere ausgeschieden und führt somit zu einer Myoglobinurie. Schädigungen von Muskelzellen können aber kurzzeitig zu einer erheblichen Zunahme der Myoglobinkonzentration im Plasma führen. Deshalb war es erforderlich, die Richtigkeit der Messung des fr. Hb in Anwesenheit von Myoglobin im Plasma zu überprüfen (3, 20). Die Konzentration an Myoglobin wurde bis 176 $\mu\text{mol/l}$ erhöht, ohne dass eine Beeinflussung der Messung niedriger (1,04 $\mu\text{mol/l}$) und hoher Hb-Konzentrationen (90,0 $\mu\text{mol/l}$) auftrat. Damit ließ sich auch ein relevanter Störeinfluss des Myoglobins ausschließen.

Trübungen, die häufig in Seren und Plasmen auftreten, führen zu unspezifischen Absorptionen im verwendeten Wellenlängenbereich (8). Vor allem Triglyzeride verursachen Plasmatrübungen und können die Messung des fr. Hb stören (12). Bei der spektralphotometrischen Methode nach Kahn werden auch diese Störeinflüsse minimiert, sodass selbst bei hohen Triglyzeridkonzentrationen (5,71 mmol/l) richtige Ergebnisse erhalten werden. Auch pH-Wert-Änderungen und unterschiedliche Proteingehalte im Plasma haben keinen Einfluss auf das Messergebnis (2).

Die Konzentration an fr. Hb liegt im Serum höher als im Heparinplasma, da es aufgrund der Koagulation und/oder Probenaufbereitung zu einer In-vitro-Hämolyse kommt (17).

Der Referenzbereich für fr. Hb beim Menschen, gemessen mit der Methode nach Kahn, liegt bei 0,37–3,17 $\mu\text{mol/l}$ mit einem Median von 1,50 $\mu\text{mol/l}$ (1). Bei dreijährigen und älteren Pferden beträgt der Referenzbereich (13) für fr. Hb im Plasma 0,09–2,01 $\mu\text{mol/l}$ bei einem Median von 0,80 $\mu\text{mol/l}$ und ist damit im Vergleich zum Menschen deutlich niedriger. Bei bis zu zwei Monate alten Pferden wurde ein Median für fr. Hb von 1,11 $\mu\text{mol/l}$ und bei ein- bis zweijährigen Pferden ein Median von

0,70 µmol/l berechnet. Ein Grund für die höheren Werte bei Fohlen bis zu einem Alter von zwei Monaten ist der Abbau des fetalen Hämoglobins, der sich bis zu einem Alter von drei Monaten hinziehen kann. Diese Arbeit ist die Grundlage zur Abgrenzung pathologischer intravasaler Hämolysen, die nun erfolgen kann.

Fazit für die Praxis

Die Konzentration des fr. Hb wurde bei gesunden Fohlen und erwachsenen Pferden erstmals quantifiziert. Der Nachweis des freien Hämoglobins erfolgt nach der spektralphotometrischen Methode nach Kahn, wobei sich als Probenmaterial nur heparinisiertes Blut eignet. Die Blutentnahme erfolgt direkt in das Probengefäß. Nach 30 Minuten wird der Plasmaüberstand bei 1100 g fünf Minuten zentrifugiert. Das so gewonnene Heparinplasma ist 48 Stunden bei 4 °C lagerbar. Der Referenzbereich des fr. Hb bei erwachsenen Pferden liegt zwischen 0,09 und 2,01 µmol/l. Eine erhöhte Konzentration des freien Hämoglobins entsteht durch intravasale Hämolyse. Hinweise auf eine bestehenden intravasalen Hämolyse geben: Erhöhung der LDH-Aktivität, MCH oder MCHC; Quotient $< 3 = \text{Hämatokrit (\%)/Hämoglobin (g/dl)}$ [= konventionelle Einheit] oder Quotient $< 0,04 \text{ Hämatokrit (l/l)/Hämoglobin (mmol/l)}$ [= SI-Einheit]; rotgefärbtes Plasma, rotgefärbter Harn (z. B. Babesiose).

Literatur

1. Bednar R, Bayer PM. Freies Hämoglobin im Plasma – Vergleich zweier spektralphotometrischer Methoden – Bilirubin als Störfaktor. *Lab Med* 1994; 18: 196–199.
2. Blakney GB, Dinwoodie AJ. A spectrophotometric scanning technique for the rapid determination of plasma hemoglobin. *Clin Biochem* 1975; 8: 96–102.
3. Boulton FE, Huntsman RG. The detection of myoglobin in urine and its distinction from normal and variant haemoglobins. *J Clin Pathol* 1971; 24: 816–821.
4. Collinder E, Nyberg F, Sanderson-Nydahl K, Gottlieb-Vedi M, Lindholm A. The opioid haemorphin-7 in horses during low-speed and high-speed treadmill exercise to fatigue. *J Vet Med A* 2005; 52: 162–168.
5. Duncan JR, Prasse KW, Mahaffey EA. *Veterinary Laboratory Medicine – Clinical Pathology*, 3rd ed. Ames: Iowa State University Press 1994; 10–29.
6. Flink EB, Watson CJ. A method for the quantitative determination of hemoglobin and related heme pigments in feces, urine, and blood plasma. *J Biol Chem* 1942; 146: 171–178.
7. Frank JJ, Bermes EW, Bickel MJ, Watkins BF. Effect of in vitro hemolysis on chemical values for serum. *Clin Chem* 1978; 24: 1966–1970.
8. Harboe M. A method for determination of hemoglobin in plasma by near-ultraviolet spectrophotometry. *Scand J Clin Lab Inv* 1959; 11: 66–70.
9. Hunter FT, Grove-Rasmussen M, Soutter L. A spectrophotometric method for quantitating hemoglobin in plasma or serum. *Am J Clin Pathol* 1950; 20: 429–433.
10. Kahn SE, Watkins BF, Bermes EW. An evaluation of a spectrophotometric scanning technique for measurement of plasma hemoglobin. *Ann Clin Lab Sci* 1981; 11: 126–131.
11. Kent JE, Harris P. Myoglobinuria: Methods for diagnosis. In: *Animal Clinical Biochemistry*. Blackmore DJ, Eckersall PD, Evans GO, Sommer H, Stoward MD, Woodman DD, eds. UK: Cambridge University Press 1988; 191–207.
12. Körmöczy GF, Säemann MD, Buchta C, Peck-Radosavljevic M, Mayr WR, Schwartz DWM, Dunkler D, Spitzauer S, Panzer S. Influence of clinical factors on the haemolysis marker haptoglobin. *Eur J Clin Invest* 2006; 36: 202–209.
13. Kraft W. Referenzbereich, Normalbereich, Normbereich, Normalwert. In: *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*. Kraft W, Dürr UM, Hrsg. Stuttgart, New York: Schattauer 2005; 1–6.
14. Muir WW, Wellman ML. Hemoglobin solutions and tissue oxygenation. *J Vet Intern Med* 2003; 17: 127–135.
15. Norman TE, Chaffin MK, Johnson MC, Spangler EA, Weeks BR, Knight R. Intravascular hemolysis associated with severe cutaneous burn injuries in five horses. *J Am Vet Med Assoc* 2005; 226: 2039–2043.
16. Ramaiah SK, Harvey JW, Giguère S, Franklin RP, Crawford PC. Intravascular hemolysis associated with liver disease in a horse with marked neutrophil hypersegmentation. *J Vet Intern Med* 2003; 17: 360–363.
17. Schusser GF, May M, Meister A, Ohnmar Kyaw W, Lobeck T, Uhlig A. Kontinuierliche unkonjugierte Hyperbilirubinämie beim Pferd – Ähnlichkeit mit dem Gilbert-Meulengracht-Syndrom. *Tierärztl Prax* 2007; 35 (G): 75–80.
18. Solberg HE. The theory of reference values. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987; 25: 645–656.
19. Weiss DJ, Moritz A. Equine immune-mediated hemolytic anemia associated with *Clostridium perfringens* infection. *Vet Clin Pathol* 2003; 32: 22–26.
20. Zheng Q, Liu Z, Cai R. Determination of myoglobin based on its enzymatic activity by stopped-flow spectrophotometry. *Spectrochim Acta A* 2005; 61: 1035–1038.

Prof. Dr. Dipl. ECEIM Gerald Fritz Schusser
 Medizinische Tierklinik
 Veterinärmedizinische Fakultät
 der Universität Leipzig
 An den Tierkliniken 11
 04103 Leipzig
 E-Mail: schusser@vmf.uni-leipzig.de

2.2 Publikation 2: Freies Hämoglobin und Tumor-Nekrose-Faktor- α im Blut von Pferden mit Kolik oder akuter Kolitis

Publiziert in Berl Münch Tierärztl Wochenschr. 2008; 121: 440-5.

Berl Münch Tierärztl Wochenschr 121,
440–445 (2008)
DOI 10.2376/0005-9366-121-440

© 2008 Schlütersche
Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG
ISSN 0005-9366

Korrespondenzadresse:
schusser@vmf.uni-leipzig.de

Eingegangen: 14.03.2008
Angenommen: 01.08.2008

Zusammenfassung

Medizinische Tierklinik, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig¹
Institut für klinische Immunologie, Medizinische Fakultät, Universität Leipzig²

Freies Hämoglobin und Tumor-Nekrose-Faktor- α im Blut von Pferden mit Kolik oder akuter Kolitis

Free hemoglobin and tumor necrosis factor- α in blood of horses with colic or acute colitis

Win Ohnmar Kyaw¹, Albrecht Uhlig¹, Gábor Köller¹, Ulrich Sack²,
Gerald Fritz Schusser¹

Fünzig Pferde wurden aufgrund der klinischen und labormedizinischen Untersuchungsbefunde in 4 Gruppen eingeteilt: Gruppe 1 (n = 14) gesunde Pferde, Gruppe 2 (n = 13) Pferde mit nichtstrangulierter Obstruktion, Gruppe 3 (n = 11) Pferde mit Strangulation (Dünndarm oder Dickdarm) und Gruppe 4 (n = 12) Pferde mit akuter Kolitis und hochgradiger Entzündung (Peritonitis oder Thrombophlebitis). Elf Pferde der Gruppen 3 (4 Pferde mit Dünndarmstrangulation und hämolytischem Bauchpunktat) und 4 (7 Pferde mit septischer Peritonitis) wurden wegen infauster Prognose euthanasiert und bildeten die Gruppe 5. Bei allen Pferden wurde freies Hb mit der Methode nach Kahn bestimmt und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) mit dem Duo Set ELISA Development Kit gemessen.

Zwischen den Gruppen 1 und 2 konnten keine Unterschiede von fr. Hb und TNF- α festgestellt werden. Bei Pferden der Gruppe 3 (Median: 8,0 μ mol/l; 14665 pg/ml) und 4 (9,1; 15081) wurden dagegen signifikant höhere Konzentrationen von fr. Hb und TNF- α im Vergleich zu den Pferden der Gruppe 1 (0,61; 573) und 2 (0,5; 821) gemessen. Weiterhin bestand eine positive gesicherte Korrelation ($r = 0,82$, $P = 0,01$) zwischen der Konzentration an fr. Hb und TNF- α in Gruppe 4. Die Konzentrationen von fr. Hb und TNF- α der euthanasierten Pferde der Gruppe 5 waren signifikant ($p < 0,01$) höher als bei den konservativ behandelten Pferden der Gruppe 2. Die erhöhte Konzentration von fr. Hb, welches als proinflammatorischer Mediator angesehen wird, könnte die Produktion des proinflammatorischen Zytokins TNF- α stimulieren. Beide Parameter könnten somit zum systemisch inflammatorischen Responsesyndrom beitragen, das zu den klinischen Symptomen Fieber, Tachykardie und Tachypnoe sowie zu den labormedizinischen Befunden Leukopenie, Thrombozytopenie und Laktatazidose führt. Aufgrund dieser Ergebnisse sprechen erhöhte Konzentrationen von fr. Hb und TNF- α bei Pferden mit Dünndarmstrangulation und hämolytischem Bauchpunktat oder septischer Peritonitis für eine schlechte Prognose.

Schlüsselwörter: Pferd, Kolik, Strangulationsileus, akute Kolitis, freies Hämoglobin, TNF- α

Summary

A total of 50 adult horses were classified into 4 groups: healthy horses (group 1, n = 14), horses with non-strangulation obstruction (group 2, n = 13), horses with strangulation obstruction (group 3, n = 11) and horses with acute colitis and severe inflammation (peritonitis or thrombophlebitis) (group 4, n = 12). Eleven euthanized horses recreated from group 3 (4 horses with small intestinal strangulation obstruction and hemolytic peritoneal fluid) and group 4 (7 horses with septic peritonitis) were taken as group 5. Free hemoglobin (fr. Hb) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were measured by method of Kahn and by Duo Set ELISA Development Kit. The concentrations of fr. Hb and TNF- α were significantly higher ($p < 0.01$) in group 3 (medians: 8.0 μ mol/l; 14665 pg/ml) and group 4 (9.1; 15081) in comparison to healthy horses (0.61; 573) and group 2 (0.5; 821), whereas group 2 showed no significant difference with group 1. There was a positive correlation between fr. Hb and TNF- α ($r = 0.82$; $P = 0.01$) in group 4. Concentrations of both fr. Hb and TNF- α were significantly ($p < 0.01$) higher in euthanized horses of group 5 than in medically treated horses of group 2. The high concentration of fr. Hb could be a proinflammatory mediator to stimulate high production of TNF- α known as a proinflammatory cytokine. Both of these parameters could contribute to the pathogenesis of systemic

U.S. Copyright Clearance Center
Code Statement:
0005-9366/2008/12111-440 \$ 15.00/0

inflammatory response syndrome: fever, tachycardia, tachypnoe, leukopenia, thrombocytopenia, and lactic acidosis. Based on this, increased concentrations of both fr. Hb and TNF- α could be a guarded prognostic indicator in horses with strangulation obstruction, acute colitis or septic peritonitis.

Keywords: horse, colic, strangulation obstruction, acute colitis, free Hemoglobin, TNF- α

Einleitung

Nach Erythrozytolyse liegt das freie Hämoglobin (fr. Hb) im Plasma in Form eines α - β -Dimers vor. Dieses Dimer verbindet sich mit Haptoglobin, das anschließend durch CD163-Makrophagen, befindlich vorwiegend in der Leber und Milz sowie zu einem geringen Teil im peripheren Blut, phagozytiert und aus dem Blutkreislauf entfernt wird (Schaer et al., 2007). Der Referenzbereich des fr. Hb im Plasma von gesunden adulten Pferden liegt bei 0,09–2,01 μ mol/l (Ohnmar Kyaw et al., 2007). Pathologische Vorgänge steigern die intravaskuläre Hämolyse und die Konzentration an fr. Hb im Blut nimmt zu. Verantwortlich dafür sind Antigen-Antikörper-Reaktionen auf der Erythrozytenoberfläche (Weiss, 2003), physikalische Schädigungen des Gewebes durch Trauma oder disseminierte intravaskuläre Koagulopathie (DIC) bzw. Vaskulitis (Goyette et al., 2004), oxidativer Stress durch die Einwirkung von Oxidantien bei Vergiftungen mit rotem Ahorn (Alward et al., 2006), osmotische Hämolyse bei Verbrennungen (Norman et al., 2005), Infektionen (Equine Infektiöse Anämie, *Clostridium perfringens*, Leptospirose, Babesien; Ramaiah et al., 2003) und Endotoxämie (Bone, 1991). Aus klinischer Sicht tritt 12 bis 24 Stunden nach einer hochgradigen, intravaskulären Erythrozytolyse eine Hämoglobinurie auf, die mit einer Erhöhung des indirekten Bilirubins und einer Steigerung der LDH-Aktivität einhergeht (Duncan et al., 1994). Nach erhöhter Erythrozytolyse wird die Hämoglobinclearance mittels Haptoglobin und CD163-Makrophagen überschritten, so dass Hämoglobin mittels Stickstoffmonoxid zu Eisenhäm oxidiert wird und somit die Bioaktivität von Stickstoffmonoxid limitiert. Eisenhäm seinerseits wirkt proinflammatorisch und prooxidativ auf Endothelzellen. Die Verarmung an Stickstoffmonoxid im Blut führt zur Aktivierung der Thrombozyten und folglich zu ihrer Aggregation, zur Verschlechterung des Tonus der glatten Muskulatur (Gefäße und Darm) und zum viszeralem Schmerz (Rother et al., 2005). Eine erhöhte Konzentration von fr. Hb stimuliert die Produktion von TNF- α (McFaul et al., 2000; Carrillo et al., 2001; Liese et al., 2001; Bordet et al., 2007).

TNF- α , ein wichtiges Zytokin für die Regulation inflammatorischer und immunologischer Prozesse, wird von Monozyten oder Makrophagen, die durch Endotoxin aktiviert werden, produziert (Westendorp et al., 1997). Die Endotoxämie ist eine der häufigsten Ursachen für lebensbedrohliche Komplikationen bei Magen-Darm-Krankheiten des Pferdes in allen Altersgruppen. Endotoxin wird auch im Darminhalt gesunder Pferde nachgewiesen (MacKay, 1992). Zu einem Anstieg der Endotoxinkonzentration im Blut der Pferde kommt es, in jedem Fall, nach einer Schädigung der Mukosabarriere der Darmschleimhaut, infolge eines Strangulationsileus oder einer akuten Kolitis (Brown et al., 2006). Eine Erhöhung des TNF- α im Serum fanden verschiedene Auto-

ren in Verbindung mit schweren Magen-Darm-Krankheiten bei adulten Pferden und bei Fohlen mit Septikämie (Morris et al., 1991; Weiss und Evanson, 2002).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Verhalten der Konzentrationen an freiem Hb und TNF- α bei gesunden Pferden und bei Pferden mit Kolik oder akuter Kolitis zu untersuchen und Zusammenhänge aufzuzeigen.

Material und Methoden

In die Untersuchungen wurden 50 Pferde einbezogen. Alle Pferde wurden einer allgemeinen klinischen und labormedizinischen Untersuchung sowie einem speziellen Kolikuntersuchungsgang unterzogen. Vierzehn erwachsene, klinisch unauffällige Pferde (13 Warmblüter, 1 Kaltblüter, 3–5 Jahre alt, 14 Wallache) bildeten die Gruppe 1 (Kontrollgruppe). Bei 36 weiteren Pferden, die mit Kolik in die Medizinische Tierklinik der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig zur Einweisung kamen, erfolgte aufgrund der Diagnose, die als Einschlusskriterium galt, die Einteilung in drei Gruppen. In Gruppe 2 ($n = 13$; 12 Warmblüter, 1 Pony, 1 bis 20 Jahre alt, 6 Wallache, 6 Stuten, 1 Hengst) wurden alle Pferde mit einer nichtstrangulierenden Obstruktion (2 Pferde mit Krampfkolik, 4 Pferde mit Obstipation der linken ventralen Längslage des großen Kolons, 7 Pferde mit Verlagerung der linken Längslagen über das Milz-Nieren-Band) zusammengefasst. Gruppe 3 ($n = 11$; 7 Warmblüter, 3 Haflinger, 1 Pony, 3 bis 12 Jahre alt, 7 Wallache und 4 Stuten) beinhaltete alle Pferde mit einer Strangulation des Dünn- oder Dickdarmes (3 Pferde mit Torsio coli totalis, 8 Pferde mit Dünndarmstrangulation) und in Gruppe 4 ($n = 12$; 10 Warmblüter, 1 Haflinger, 1 Vollblut, 3 bis 23 Jahre alt, 6 Wallache und 6 Stuten) wurden alle Pferde mit akuter Kolitis, die auch eine septische Peritonitis (9 Pferde) oder septische Thrombophlebitis (3 Pferde) hatten, zusammengefasst. Die Gruppe 5 enthielt jene 11 Patienten aus Gruppe 3 (4 Patienten mit Dünndarmstrangulationsileus und hämolytischem Bauchpunktat) und 4 (7 Patienten mit septischer Peritonitis), die aufgrund infauster Prognose euthanasiert wurden.

Für die nachfolgenden Untersuchungen wurde bei allen 50 Pferden Blut aus der *V. jugularis externa* mit einer 18 G Kanüle unmittelbar nach der Einlieferung entnommen. Eine sorgfältige Punktion und seitliches Hineinfließen in ein Lithiumheparinröhrchen verhinderte dabei die iatrogene Hämolyse. Die heparinisierten Blutproben standen nach der Entnahme 30 Minuten bei Zimmertemperatur, danach wurde der Überstand 5 Minuten bei 1100 g zentrifugiert, um ein hämolysefreies Plasma, für die Bestimmung von fr. Hb, zu bekommen. EDTA- und Serumröhrchen wurden für das Blutbild und die Bestimmung der klinisch-chemischen Parameter benutzt. Das Blutbild (Erythrozyten, Hämatokrit, Hämoglobin, Leukozyten, Thrombozyten)

TABELLE 1: Objektive klinische Befunde (innere Körpertemperatur, Herzfrequenz, Atmungsfrequenz,) der Kontrollgruppe und der kolikkranken (Gruppe 2, 3), kolitiskranken (Gruppe 4) und euthanasierten Pferde (Gruppe 5)

klinische Untersuchung	Referenzbereich	Gruppe 1 (n = 14) x ± σ (Min-Max)	Gruppe 2 (n = 13) x ± σ (Min-Max)	Gruppe 3 (n = 11) x ± σ (Min-Max)	Gruppe 4 (n = 12) x ± σ (Min-Max)	Gruppe 5 (n = 11) x ± σ (Min-Max)
rektal Temperatur (°C)	37,5–38,0	37,5 ± 0,25 (37–37,7)	37,8 ± 0,47 (37,2–38,9)	38,6 ± 0,9 (36,3–40,1)	38,7 ± 0,6 (38–40,3)	39 ± 1 (36,3–40,3)
Herz 1/min	24–40	40 ± 4 (32–44)	44 ± 7 (28–52)	72 ± 22 (52–120)	63 ± 11 (52–80)	98 ± 17 (72–120)
Atmung 1/min	8–14	17 ± 0,1 (16–18)	21 ± 4 (12–28)	38 ± 24 (20–104)	31 ± 11 (20–60)	33 ± 12 (20–60)

TABELLE 2: Hämatologische Befunde der Kontrollgruppe und Gruppen 2–5: Die fr. Hb-Konzentration ist signifikant höher ($p < 0,01$) und die Thrombozytenzahl ist signifikant niedriger ($p < 0,01$) in der Gruppe 3 (Pferde mit Strangulation), Gruppe 4 (Pferde mit akuter Kolitis) und Gruppe 5 (euthanasierte Pferde aus den Gruppen 3 und 4) als in der Kontrollgruppe und in der Gruppe 2 (Pferde mit nicht strangulierter Obstruktion). Gruppen mit verschiedenen Hochzahlen sind signifikant unterschiedlich

Parameter	Referenzbereich	Median, (1. und 3. Quartil)				
		Gruppe 1 (n = 14)	Gruppe 2 (n = 13)	Gruppe 3 (n = 11)	Gruppe 4 (n = 12)	Gruppe 5 (n = 11)
fr. Hb (μmol/l)	0,09–2,01	0,61 ¹ (0,28–0,96)	0,5 ¹ (0,25–0,99)	8,0 ² (4,6–16,3)	9,1 ² (8,5–11,3)	9,38 ² (7,12–16,13)
Hämatokrit (l/l)	0,32–0,48	0,34 ¹ (0,32–0,37)	0,33 ¹ (0,32–0,36)	0,39 (0,3–0,47)	0,39 (0,28–0,44)	0,45 ² (0,45–0,55)
Erythrozyten (T/l)	6,8–12,9	8,79 (8,34–9,12)	7,8 (7,16–8,13)	9,06 (8,0–12)	8,82 (6,62–10,02)	10,29 (8,82–12,29)
Hb (mmol/l)	6,8–11,8	8,9 (8,38–9,63)	8,2 (7,9–9,3)	9,7 (8,1–12,0)	10,0 (6,85–12,0)	11,6 (9,45–12,36)
Leukozyten (G/l)	5,4–10,0	8,1 (7,4–9,73)	8,9 (6,9–10,8)	8,0 (3,8–14)	4,15 (3,4–13)	4 (3,4–13)
Thrombozyten (G/l)	100–600	196 ¹ (183–208)	137 ¹ (130–175)	79 ² (43–96)	88 ² (73–125)	70 ² (64–101)

TABELLE 3: Klinische-chemische Befunde der Kontrollgruppe und der Gruppe 2 (Pferde mit nicht strangulierter Obstruktion), 3 (Pferde mit Strangulation), 4 (Pferde mit akuter Kolitis) und 5 (euthanasierte Pferde aus den Gruppen 3 und 4): Gruppen mit verschiedenen Hochzahlen sind signifikant unterschiedlich

Parameter	Referenzbereich	Median (1. und 3. Quartil)				
		Gruppe 1 (n = 14)	Gruppe 2 (n = 13)	Gruppe 3 (n = 11)	Gruppe 4 (n = 12)	Gruppe 5 (n = 11)
TNF-α (pg/ml)		573,8 ¹ (88,0–907,08)	821,6 ¹ (356,75–1230,65)	14665,0 ² (7259,0–33476,0)	15081,5 ² (2087,0–49343,25)	33476 ² (8819,0–68830,0)
Gesamtbilirubin (μmol/l)	0–45	27,75 ¹ (21,53–30,85)	48,10 ² (28,45–118,92)	60,90 ² (45,80–90,10)	90,10 ² (53,70–112,85)	70,10 ² (55,80–90,10)
direktes Bilirubin (μmol/l)	0–9	8,45 ¹ (7,25–8,7)	9,6 ² (8,4–11,05)	15,0 ² (11–17)	13,0 ² (11,5–15,6)	14,20 ² (12,8–17)
indirektes Bilirubin (μmol/l)	4–36	19,4 ¹ (14,38–22,18)	40,2 ² (19,55–104,57)	45,2 ² (30,6–75,9)	74,6 ² (40,38–102,03)	56,10 ² (34,8–75,9)
LDH (U/l)	162–412	311,5 ¹ (268,5–391,0)	371,0 ¹ (268,5–427,0)	935,0 ² (423,0–1497,0)	412,5 ² (303,5–761,75)	935 ² (540,0–1497,0)
Laktat (mmol/l)	1,1–1,7	0,91 ¹ (0,82–1,06)	1,53 ¹ (1,15–1,77)	5,0 ² (2,76–7,98)	2,28 ² (1,74–4,61)	5,99 ² (2,31–16,8)

und die klinisch-chemischen Parameter (indirektes und direktes Bilirubin, Laktatdehydrogenase, Laktat) wurden eine Stunde nach der Blutentnahme gemessen. Die Seren für die Bestimmung von TNF-α wurden bei –21 °C gelagert (User Manual, R&D Systems).

Das heparinisierte Blutplasma wurde auf fr. Hb mittels UV/Vis-Spektralphotometer DU 640B (Beckman-Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) unter Verwendung von Einmalküvetten (Ratiolab GmbH, Dreieich, Deutschland) nach der Methode nach Kahn et al. (1981) untersucht. Das Blutbild wurde mit dem hämatologischen Messsystem ADVIA® 120 (Bayer HealthCare, Deutschland) erstellt. Die klinisch-chemischen Parameter wurden mit dem Hitachi 912 Automatic Analyzer (Boehringer, Deutschland) gemessen. Die Bestimmung von TNF-α im Serum erfolgte mit dem Duo Set ELISA Development Kit für Equine TNF-α Assay (R&D Systems, USA).

Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der vorliegenden Ergebnisse erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS 14.0 (SPSS Software GmbH, München). Nach einer Prüfung auf Normalverteilung mit dem Shapiro-Wilk-Test erfolgte die Berechnung der deskriptiven Statistik. Für normalverteilte Parameter wurde das arithmetische Mittel und die Standardabweichung und für nicht normalverteilte Parameter wurden der Median und das erste und dritte Quartil berechnet. Für Vergleiche zwischen mehr als zwei unabhängigen Stichproben normalverteilter Parameter kamen die Varianzanalyse und das Bonferroni-Verfahren als Post-Hoc-Test zur Anwendung. Gruppenvergleiche nicht normalverteilter Parameter erfolgten mittels Kruskal-Wallis und Mann-Whitney-U Test. Die Korrelation nach Pearson wurde für Korrelationen zwischen den Parametern benutzt.

Die Testergebnisse mit $p \leq 0,05$ wurden als signifikant bezeichnet.

Ergebnisse

Klinische Befunde

Die objektiven klinischen Befunde aller fünf Gruppen sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die Kolikdauer betrug bei Pferden der Gruppe 2 2 bis 22 Stunden, 2 bis 24 Stunden in der Gruppe 3, 10 bis 48 Stunden in der Gruppe 4 und 24 bis 48 Stunden in der Gruppe 5. Die euthanasierten Pferde der Gruppe 5 hatten bei Aufnahme in der Klinik im Vergleich zu den Pferden der Gruppen 1 und 2 signifikant höhere ($p < 0,01$) innere Körpertemperaturen, Herz- und Atmungsfrequenzen.

Labormedizinische Befunde

Die Ergebnisse der hämatologischen Untersuchungen sind in Tabelle 2 aufgeführt. Die hämatologischen Befunde der Pferde der Kontrollgruppe waren alle im physiologischen Referenzbereich. Zwischen der Kontrollgruppe und den Gruppen 2, 3 und 4 gab es keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Erythrozytenzahl, dem Hämatokrit und der Hämoglobinkonzentration. Die Konzentration des fr. Hb war in der Kontrollgruppe und in Gruppe 2 innerhalb des Referenzbereiches. Dagegen war sie in den Gruppen 3, 4 und 5 signifikant höher ($p < 0,01$) als in der Kontrollgruppe und in der Gruppe 2. Zwischen den Gruppen 1 und 2 wurde kein signifikanter Unterschied bezüglich der fr. Hb-Konzentration festgestellt. Zwei von 11 Pferden der Gruppe 3 hatten eine geringgradige normozytäre, normochrome Anämie (Kolikdauer: 6 und 8 Stunden; Diagnose: Dünndarmstrangulation, Torsio coli totalis; Erythrozyten 5,6 und 6,6 T/l; Hämoglobin 5,7 und 6,8 mmol/l; fr. Hb 6,74 und 3,02 $\mu\text{mol/l}$; TNF- α 12 084 und 3 366 pg/ml). Drei von zwölf Pferden der Gruppe 4 hatten eine höhergradige normozytäre, normochrome Anämie (Krankheitsdauer: 10, 48 und 24 Stunden; Komplikation: bei zwei Pferden septische Peritonitis und bei einem Pferd septische Thrombophlebitis; Erythrozyten 6,2, 1,7, 4,8 T/l; Hämoglobin 6,6, 2,1, 5,6 mmol/l; fr. Hb 5,95, 9,95, 11,79 $\mu\text{mol/l}$; TNF- α 3280, 68 830, 19 825 pg/ml). In der Gruppe 3 hatten 3 von 11, und in der Gruppe 4 hatten 2 von 12 Pferden einen erhöhten Hämatokrit (0,48–0,60 l/l).

Die Pferde in den Gruppen 3 und 4 wiesen im Vergleich zu denen in der Kontrollgruppe und in der Gruppe 2 eine signifikant niedrigere Thrombozytenzahl ($p < 0,05$) auf. Jeweils acht Pferde aus den Gruppen 3 und 4 hatten zudem eine Thrombozytopenie mit Thrombozytenzahlen unter dem Referenzbereich von 100 G/l. Bei 5 von 11 Pferden der Gruppe 3 und bei 8 von 12 Pferden der Gruppe 4 lag eine Leukopenie ($< 4,1$ G/l) und bei 5 von 11 Pferden der Gruppe 3 und bei 4 von 12 Pferden der Gruppe 4 eine Leukozytose (> 13 G/l) vor. Lediglich ein Pferd in Gruppe 3 zeigte eine physiologische Leukozytenanzahl mit einer Linksverschiebung ($> 10\%$ stabkernige, neutrophile Granulozyten). Signifikante Unterschiede bezüglich der Leukozytenzahlen zwischen den Gruppen waren nicht nachweisbar. Toxische neutrophile Granulozyten und fragmentierte Erythrozyten (Schistozyten) fanden sich bei Patienten mit intravaskulärer Hämolyse (Abb. 1 und 2).

Die Ergebnisse der klinisch-chemischen Befunde sind in Tabelle 3 aufgeführt. In den Gruppen 2 ($p < 0,05$), 3 und 4 ($p < 0,01$) lag im Vergleich zur Kontrollgruppe

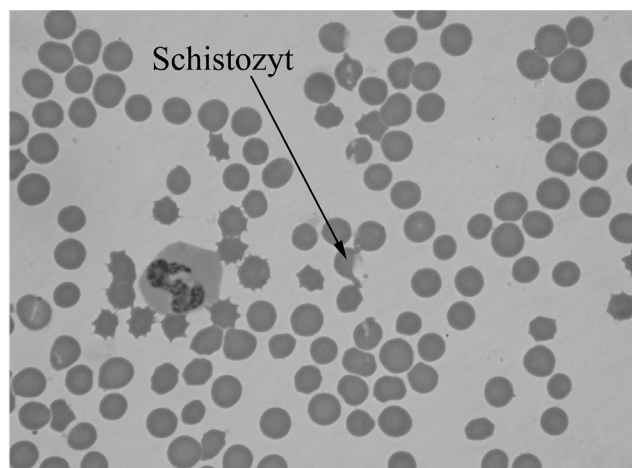


ABBILDUNG 1: Schistozyt (Diff-Quick, 1000x) im Blutausstrich eines Pferdes der Gruppe 3 mit Dünndarmmyleus (6,74 $\mu\text{mol/l}$ fr. Hb/l, 12 084 pg TNF- α /ml).

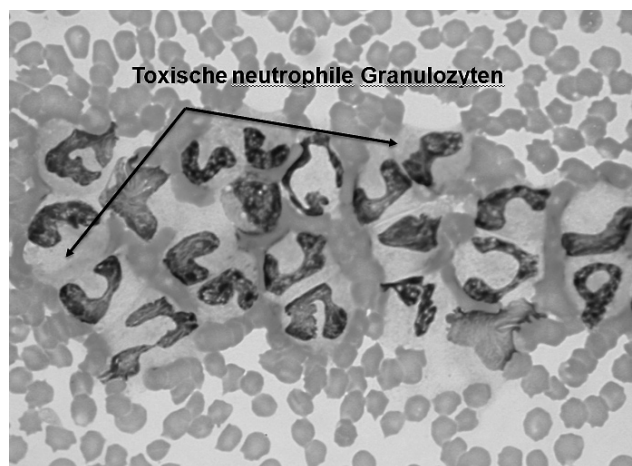


ABBILDUNG 2: Toxische neutrophile Granulozyten (Diff-Quick, 1000x) im Blutausstrich eines Pferdes der Gruppe 4 mit akuter Kolitis (9,38 $\mu\text{mol/l}$ fr. Hb/l, 40 872 pg TNF- α /ml).

eine signifikant höhere Konzentration an indirektem Bilirubin vor. In Gruppe 3 waren die Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) und die Konzentration an Laktat im Vergleich zu den Gruppen 1 und 2 signifikant höher ($p < 0,01$). Auch in Gruppe 4 waren die LDH-Aktivität und die Laktatkonzentration im Vergleich zu den Gruppen 1 und 2 signifikant erhöht ($p < 0,05$).

Es gab keine signifikanten Unterschiede der TNF- α Konzentration zwischen den Gruppen 1 und 2. Die TNF- α Konzentration in den Gruppen 3 und 4 war signifikant höher ($p < 0,01$) als in der Kontrollgruppe und in der Gruppe 2. Zwischen den Konzentrationen an fr. Hb und TNF- α in Gruppe 4 war eine positive, statistisch gesicherte Korrelation ($r = 0,82$; $p < 0,01$) nachweisbar. Die höchsten Konzentrationen an fr. Hb (20,55 $\mu\text{mol/l}$) und TNF- α (212 669 pg/ml) wurden bei einem Patienten der Gruppe 4 mit hochgradiger, septischer Peritonitis, bei dem zudem viele gramnegative und -positive Bakterien in der Bauchhöhle gefunden wurden, gemessen.

Die Pferde der Gruppe 5 hatten signifikant höhere Werte in Hämatokrit, Laktat und LDH als Pferde der Gruppen 1 und 2 ($p < 0,05$). Eine hochgradig signifikante Erhöhung ($p < 0,01$) der Werte des fr. Hb und des TNF- α war in der Gruppe 5 im Vergleich zu den Grup-

pen 1 und 2 zu verzeichnen. Die Thrombozytenzahl der Gruppe 5 war absolut und signifikant ($p < 0,01$) niedriger als die der Gruppen 1 und 2 (Tab. 2 und 3).

Diskussion

Klinische Parameter, wie Fieber oder erniedrigte innere Körpertemperatur, Tachypnoe und Tachykardie, verminderte Hautelastizität, gerötete Schleimhäute, kalte Akren, Thrombozytopenie, Leukopenie ($< 4,1 \text{ G/l}$), Leukozytose ($> 13 \text{ G/l}$) oder Linksverschiebung ($> 10 \%$ stabkernige neutrophile Granulozyten) waren Symptome des systemisch-inflammatorischen Response-Syndroms (SIRS) in den Gruppen 3 und 4 (Riedemann et al., 2003). Die Thrombozyto- und Leukopenie sowie die Linksverschiebung sind besondere Hinweise für eine bestehende Endotoxämie infolge einer Zerstörung der Darmschleimhautbarriere bei Pferden mit Strangulationsileus, akuter Kolitis oder septischer Peritonitis (Moore und Morris, 1992).

Endotoxine werden vom Lipopolysaccharid-Bindungsprotein (LBP) gebunden. Dies ermöglicht die Bindung an den CD14-Rezeptor und den Toll-like-Rezeptor-4 der Makrophagen der Darmwand und der Leber, so dass folglich die Phagozytose der Endotoxine erfolgt. Dadurch werden die Makrophagen aktiviert Zytokine, wie IL-1, IL-6, IL-8, PAF und TNF- α , zu produzieren, die wiederum neutrophile Granulozyten stimulieren und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) freisetzen (Weiss und Evanson, 2002; 2003). Unter dem Einfluss der ROS wird die Lipid- und Proteinstruktur der Erythrozytenmembran verändert und dadurch kommt es zur Erythrozytolyse (Claster et al., 1984; Hatherill et al., 1986; Roth 1994; Liese et al., 2001). Im Zuge der komplementvermittelten Antigen (Endotoxin)-Antikörperreaktion entsteht ein Alternativweg zur Auflösung der Erythrozytolyse, wobei über eine C3-Hydrolyse C5b, C6 bis C9-Verbindungen entstehen, die die Erythrozytenmembran ebenfalls schädigen und zur Zellyse führen (Bardakhch'yan et al., 1992; Liese et al., 2001). Freies Hb entsteht auch beim gesunden Pferd intravaskulär und ist somit im Blut nachweisbar (Ohnmar Kyaw et al., 2007). Durch eine Endotoxämie und die dadurch in Gang gesetzten Mechanismen kommt es zur Schädigung der Erythrozytenmembran. Die intravaskuläre Konzentration des fr. Hb ist dementsprechend bei Pferden mit Kolik oder akuter Kolitis erhöht. Von den untersuchten 36 Kolikpferden zeigten 23 Pferde (64 %), davon 11 Pferde mit Strangulation des Darmes (Gruppe 3) und 12 Pferde mit akuter Kolitis (Gruppe 4), erhöhte Konzentrationen an fr. Hb und TNF- α im Blut. Jedoch nur fünf Pferde wiesen eine Anämie auf. Die Anämie der zwei Pferde mit Strangulationsileus der Gruppe 3 war somit auf eine vorausgegangene intravaskuläre Hämolyse und auf die intraluminale Blutung des hämorrhagisch infarzierten Dünndarmes bzw. großen Kolons zurückzuführen. Die Anämie der drei Pferde mit septischer Peritonitis bzw. septischer Thrombophlebitis der Gruppe 4 wäre somit hauptsächlich infolge intravaskulärer Hämolyse erklärbar (Okumiya et al., 2004). Da bei septischer Peritonitis und Thrombophlebitis neutrophile Granulozyten massiv infiltrieren und ROS produzieren, könnten die ROS die intravaskuläre Hämolyse intensivieren (Powell et al., 1991). Die erhöhte Konzentration des indirekten Bilirubins der Pferde (7 von 13) der Gruppe 2 war aufgrund des Inanitionsikterus infolge der 18 bis 22-stündigen Inappetenz zurückzuführen, wobei die fr. Hb-Konzentration nicht erhöht war (Gronwall und Mia, 1972). Folglich war die signifikante Erhöhung der

indirekten Bilirubinkonzentration der Pferde der Gruppen 3 und 4 auf die lange Krankheitsdauer mit Inappetenz (Inanitionsikterus), die signifikant hohe fr. Hb-Konzentration (intravaskuläre Hämolyse) und die Endotoxinbelastung der Leberfunktion zurückzuführen (Suliman et al., 2003). Nach intravaskulärer Hämolyse steigt auch die LDH-Aktivität, weil in den Erythrozyten eine hohe LDH-Konzentration vorliegt (Duncan et al., 1994). Die LDH-Aktivitätssteigerung bei den Gruppen 3 und 4 entwickelte sich parallel zur Erhöhung des fr. Hb. Fünf von 11 Pferden mit Strangulationsileus der Gruppe 3 und 8 von 12 Pferden mit akuter Kolitis oder septischer Peritonitis der Gruppe 4 hatten eine Leukopenie, die auf eine Endotoxämie hinwies. Diese Leukopenien korrelierten mit signifikant erhöhten Laktatkonzentrationen, somit wären diese Konzentrationen große Hinweise auf eine bestehende Endotoxämie (Nappert and Johnson, 2001).

Das intravaskuläre fr. Hb wird an das Plasmaprotein Haptoglobin gebunden. Dieser Hämoglobin-Haptoglobulin (Hb-Hp)-Komplex wird durch die Makrophagen in der Leber und der Milz über den Hämoglobin-Scavenger-Rezeptor CD163 phagozytiert. Die CD163-Rezeptoren auf der Zelloberfläche der Monozyten werden durch Endotoxin reduziert und somit die Hb-Hp-Aufnahme herabgesetzt. Damit trägt der Hb-Hp-Komplex zur Pathogenese der systemischen Entzündung bei (Schaer et al., 2007).

In unseren Untersuchungen war die TNF- α -Konzentration im Serum nur bei Patienten mit Strangulation oder akuter Kolitis hoch, so dass nur diese Patienten Fieber, Tachykardie und Tachypnoe entwickelten. Diese klinischen Symptome waren somit Ausdruck einer systemischen Entzündungsreaktion. Die Ursache der signifikant höheren TNF- α -Konzentration im Blut könnte einerseits die erhöhte fr. Hb-Konzentration (Carrillo et al., 2001) und andererseits eine erhöhte Endotoxin-Konzentration im Blut sein (Barton und Collatos, 1999). Schon 1 μg freies Endotoxin im Blutkreislauf verursacht eine systemische Entzündungsreaktion mit Erhöhung des TNF- α (MacKay, 1992; Barton und Collatos, 1999). Werden nun die klinischen Symptome und labormedizinischen Ergebnisse der Pferde der Gruppe 3 und 4 herangezogen, so bildeten Fieber, Tachykardie, Tachypnoe, Hämoglobinämie (fr. Hb), erhöhte TNF- α -Konzentration, Thrombozytopenie, Hyperbilirubinämie, erhöhte LDH-Aktivität und Laktatazidose die Zeichen des SIRS (Oikawa und Yomaoka, 2003).

Carrillo et al. (2001) zeigten in einem *in vitro*-Experiment mit humanen Monozyten, dass die Konzentration von TNF- α in einer Zellkultur nach 24-stündiger Inkubation mit 1,55 $\mu\text{mol/l}$ fr. Hb auf 1135 pg/ml anstieg. Unter gleichen Bedingungen zeigte die Kultur von Monozyten nach Hinzugabe von 10 ng/ml Lipopolysaccharid (LPS) eine Erhöhung der TNF- α -Konzentration von 2294 pg/ml. Die Kombination von 1,55 $\mu\text{mol/l}$ fr. Hb mit 10 ng/ml LPS erhöhte die TNF- α -Konzentration jedoch auf 2501 pg/ml.

In dem *in vitro*-Experiment von McFaul et al. (2000) wurde gefunden, dass fr. Hb Leukozyten zu vermehrter TNF- α -Produktion stimuliert. Fr. Hb steigert die Wirkung von Endotoxin und erhöhte die Mortalitätsrate bei Ratten (Su et al., 1997).

In unserer Untersuchung wurde dargestellt, dass in der Gruppe 3 keine signifikante Korrelation zwischen fr. Hb und TNF- α besteht, wogegen in der Gruppe 4 eine signifikante Korrelation zwischen fr. Hb und TNF- α ermittelt wurde. Basierend auf experimentellen Untersuchungen

wird die LPS-induzierte TNF- α -Produktion in den Monozyten durch fr. Hb signifikant erhöht (Jürgens et al., 2001).

Werden nun die Pferde mit nicht strangulierter Obstruktion (Gruppe 2) mit den euthanasierten Pferden der Gruppe 5 verglichen, so fällt auf, dass die signifikante Erhöhung der fr. Hb- und TNF- α -Konzentration im Blut mit der infausten Prognose der Pferde mit Dünndarmstrangulationsileus oder mit septischer Peritonitis korreliert. Zusätzlich erschwerend bei den euthanasierten Pferden war SIRS mit Multiorganversagen.

Literatur

- Alward A, Corriher AC, Barton MH, Sellon DC, Blikslager AT, Jones SL (2006):** Red maple (*Acer rubrum*) leaf toxicosis in horses: A retrospective study of 32 Cases. *J Vet Intern Med* 20: 1197–1201.
- Bardakhch'yan EA, Kharlanova NG (1992):** Effect of *E. coli* endotoxin on erythrocyte morphology and blood iron level in rats. *Bull Experim Biol Med* 114 (4): 1560–1564.
- Barton MH, Collatos C (1999):** Tumor necrosis factor and interleukin-6 activity and endotoxin concentration in peritoneal fluid and blood of horses with acute abdominal disease. *J Vet Intern Med* 13 (5): 45–64.
- Bone RC (1991):** The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med* 115 (6): 457–468.
- Bordet C, Chandad F, Grenier D (2007):** Hemoglobin and LPS act in synergy to amplify the inflammatory response. *J Dent Res* 86: 878–882.
- Brown JJ, Ollier WER, Thomson W, Matthews JB, Carter SD, Binns M, Pinchbeck G, Clegg D (2006):** TNF-SNP haplotype frequencies in equidae. *Tissue Antigens* 67: 377–382.
- Carrillo EH, Gordon LE, Richardson JD, Polk HC (2001):** Free hemoglobin enhances tumor necrosis factor- α production from isolated human monocytes. *J Trauma & Injury, Infection, and Critical Care* 52 (3): 449–452.
- Claster S, Chio DTY, Quaniha A, Lubin B (1984):** Neutrophils mediate lipid peroxidation in human red cells. *Blood* 64: 1079–1089.
- Duncan JR, Prasse KW, Mahaffey EA (1994):** Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Pathology, 3, Aufl., Iowa State University Press Ames.
- Gronwall R, Mia AS (1972):** Fasting hyperbilirubinemia in horses. *Am J Dig Dis* 17 (5): 473–476.
- Goyette RE, Key NS, Ely ES (2004):** Hematologic changes in sepsis and their therapeutic implications. *Semin Respir Crit Care Med* 25 (6): 645–659.
- Hatherill JR, Till GO, Bruner LH, Ward PA (1986):** Thermal injury, intravascular hemolysis, and toxic oxygen products. *J Clin Invest* 78: 629–636.
- Jürgens G, Müller M, Koch MH, Brandenburg K (2001):** Interaction of hemoglobin with enterobacterial lipopolysaccharide and lipid A – physicochemical characterization and biological activity. *Eur J Biochem* 268: 4233–4242.
- Kahn SE, Watkins BF, Bermes EW (1981):** An evaluation of a spectrophotometric scanning technique for measurement of plasma hemoglobin. *Ann Clin Lab Sci* 11: 126–131.
- Liese AM, Siddiqi MQ, Siegel JH, Denny T, Spolarics Z (2001):** Augmented TNF- α and IL-10 production by primed human monocytes following interaction with oxidatively modified autologous erythrocytes. *J Leukoc Biol* 70: 289–296.
- MacKay RJ (1992):** Endotoxemia. In: Robinson, N. E., (Hrsg.), Current Therapy in Equine Medicine. W. B. Saunders, Philadelphia, 225–232.
- McFaul SJ, Bowman PD, Villa VM (2000):** Hemoglobin stimulates the release of proinflammatory cytokines from leukocytes from whole blood. *J Lab Clin Med* 135: 263–269.
- Moore JN, Morris DD (1992):** Endotoxemia and septicemia in horses: experimental and clinical correlates. *J Am Vet Med Assoc* 200: 1903–1914.
- Morris DD, Moore JN, Crowe N (1991):** Serum tumor necrosis factor activity in horses with colic attributable to gastrointestinal tract disease. *Am J Vet Res* 52: 1565–1569.
- Nappert G, Johnson PJ (2001):** Determination of the acid-base status in 50 horses admitted with colic between December 1998 and May 1999. *Can Vet J* 42 (9): 703–707.
- Norman TE, Chaffin MK, Johnson MC, Spangler EA, Weeks BR, Knight R (2005):** Intravascular hemolysis associated with severe cutaneous burn injuries in five horses. *J Am Vet Med A* 226: 2039–2043.
- Ohnmar Kyaw W, Uhlig A, Grosche A, Wittek T, Meister A, Schusser GF (2007):** Spektralphotometrische Bestimmung des freien Hämoglobins im Plasma von gesunden Pferden. *Tierärztl Prax* 35: 432–438.
- Oikawa M, Yomaoka S (2003):** Clinical, haematological, and biochemical analysis of experimental endotoxemia in thoroughbred horses. *J Equine Sci* 14 (1): 5–12.
- Okumiya T, Ishikawa-Nishi M, Doi T, Kamioka M, Takeuchi H, Doi Y, Sugiura T (2004):** Evaluation of intravascular hemolysis with erythrocyte creatine in patients with cardiac valve prostheses. *Chest* 125: 2115–2120.
- Powell RJ, Machiedo GW, Rush BF, Dikdan G (1991):** Oxygen free radicals: effect on red cell deformability in sepsis. *Crit Care Med* 19: 732–735.
- Ramaiah SK, Harvey JW, Giguère S, Franklin RP, Crawford PC (2003):** Intravascular hemolysis associated with liver disease in a horse with marked neutrophil hypersegmentation. *J Vet Intern Med* 17: 360–363.
- Riedemann NC, Guo RF, Ward PA (2003):** The emergency of sepsis. *J Clin Invest* 112 (4): 460–467.
- Roth RI (1994):** Hemoglobin enhances the production of tissue factor by endothelial cells in response to bacterial endotoxin. *Blood* 83: 2860–2865.
- Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT (2005):** The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma haemoglobin: A novel mechanism of human disease. *JAMA* 293 (13): 1653–1662.
- Schaer CA, Vallerian F, Imhof A, Schoedon G, Schaer DJ (2007):** CD 163-expressing monocytes constitute an endotoxin-sensitive Hb clearance compartment within the vascular system. *J Leukoc Biol* 82: 106–110.
- Su D, Roth RI, Yoshida M, Levin J (1997):** Hemoglobin increases mortality from bacterial endotoxin. *Infection and Immunity* 65 (4): 1258–1266.
- Suliman HB, Carraway MS, Piantadosi CA (2003):** Postlipopolysaccharide Oxidative Damage of Mitochondrial DNA. *Am J Respir Crit Care Med* 167: 570–579.
- Weiss DJ, Evanson OA (2002):** Evaluation of lipopolysaccharide-induced activation of equine neutrophils. *AJVR* 63 (6): 811–815.
- Weiss DJ, Evanson OA (2003):** Evaluation of activated neutrophils in the blood of horses with colic. *AJVR* 64 (13): 1364–1368.
- Westendorp RG, Langermans JA, Huizinga TW, Elouali AH, Verweij CL, Boomsma DI, Vandenbroucke JP (1997):** Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. *Lancet* 349: 170–173.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Dipl. ECEIM Gerald Fritz Schusser
Medizinische Tierklinik, Veterinärmedizinische Fakultät
An den Tierkliniken 11, 04103 Leipzig
schusser@vmf.uni-leipzig.de

2.3 Publikation 3: Klinische und labormedizinische Befunde bei Pferden mit akuter, chronischer oder inapparenter Form der infektiösen Anämie

Publiziert in J Verbr Lebensm. 2008; 3(4): 405-10.

Klinische und labormedizinische Befunde bei Pferden mit akuter, chronischer oder inapparenter Form der infektiösen Anämie

G. F. Schusser¹, A. Spallek¹, H. Börner², U. Hörügel³, A. Uhlig¹ und W. Ohnmar Kyaw¹

¹Medizinische Tierklinik, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig, Leipzig

²Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig, Wipfratal

³Sächsische Tierseuchenkasse, Dresden

Korrespondenz an: Prof. Dr. Dipl. ECEIM Gerald Fritz Schusser, Medizinische Tierklinik, An den Tierkliniken 11, D-04103 Leipzig, Germany; Tel: 0049 341 9738321; Fax: 0049 341 9738321; E-Mail: schusser@vmf.uni-leipzig.de.

Eingegangen: 1. April 2008; angenommen: 7. April 2008

Key words: horses, equine infectious anemia, inapparent stage, clinical symptoms, clinical pathological data.

Abstract: Only 2/4 warm-blooded horses with inapparent stage of EIA showed thrombocytopenia (28, 85 G/l) and differential diagnosis with equine anaplasmosis should be done in Germany. The horses with inapparent form showed good body conditions, one-day fever until 40.5° C (3/4), few petechial hemorrhages in oral mucous membrane (1/4), mild anaemia (2/4) (6.5, 6.6 T/l), intravascular hemolysis (1/4) (2.34 µmol/l), but edema, anemic or icteric mucous membranes and hyperbilirubinemia were not found. 4/4 and 3/4 horses had high LDH (658–3300) and CK (484–1081) activities, 1/4 had high ASAT (751), GGT (14.9), GLDH (45 U/l), creatinine (230 µmol/l), hypoalbuminemia (22.7 g/l) and high BUN (2/4) (18.4, 6.9 mmol/l). A 5 years old pregnant mare imported from eastern Europe with chronic stage had poor performance, weight loss, moderate chest oedema, pale mucous membranes and petechial hemorrhages in vaginal vestibulum. Fever (39.3° C), tachycardia (84 /min), anemia (1.55 T/l), thrombocytopenia (98 G/l), hypoalbuminemia (16.6 g/l), hyperbilirubinemia (57 µmol/l) and high ASAT (822 U/l) and positive direct Coombs test were found. A 6 year old gelding with acute stage showed continuous fever (until 41.4 °C, 12 days), depression, no appetite, no weight loss, mild chest edema, pale mucous membrane, bloody nasal discharge, wheezes, tachycardia (72/min), anemia (1.66 T/l), hypoalbuminemia (22.0 g/l), very high LDH activity (2245), AST (486) and CK (316 U/l) and died suddenly. Coggins test was done for diagnosis and EIA infected horses were destroyed. Prevention: fly control, strict prevention of iatrogenic spread, annual testing, only allowance of seronegative horses at equestrian events.

Zusammenfassung: Die Thrombozytopenie (28, 85 G/l) trat bei den Warmblutpferden mit inapparenter Form der EIA bei 50% der Fälle auf, daher ist differentialdiagnostisch in Deutschland die equine Anaplasmosis zu berücksichtigen. Pferde mit inapparenter Form hatten einen guten Ernährungszustand, eintägiges Fieber bis 40,5° C (3/4), vereinzelt Petechien in der Mundschleimhaut (1/4), keine anämischen oder ikterischen Kopfschleimhäute und keine Ödeme. 2/4 Pferden hatten eine geringgradige Anämie (6,5; 6,6 T/l), 1/4 eine intravaskuläre Hämolyse (2,34 µmol/l), 0/4 eine Hyperbilirubinämie, 4/4 eine LDH- (658 – 3300), 3/4 eine CK- (484–1081), 1/4 eine ASAT- (751), je 1/4 GGT- (14,9) und GLDH-Aktivitätserhöhung (45 U/l), 1/4 eine Hypoalbuminämie (22,7 g/l), 2/4 erhöhte Harnstoff- (18,4; 6,9 mmol/l) und 1/4 Kreatininkonzentrationen (230 µmol/l). Eine 5-jährige Stute mit chronischer Form, aus Osteuropa zugekauft, hatte hochgradige Leistungsschwäche, Abmagerung, mittelgradiges Unterbrustödem, porzellanweiße Kopfschleimhäute, Petechien im *Vestibulum vaginae*, Fieber (39,3° C), Tachykardie (84/min), Anämie (1,55 T/l), Thrombozytopenie (98 G/l), positiven direkten Coombs Test, Hypoalbuminämie (16,6), Hyperbilirubinämie (57 µmol/l) und ASAT-aktivitätserhöhung (822). Ein 6-jähriger Wallach mit akuter Form zeigte kontinuierliches Fieber über 12 Tage bis 41,4° C, Apathie, Inappetenz, keine Abmagerung, geringgradiges Unterbrustödem, porzellanweiße Kopfschleimhäute, blutigen Nasenausfluss, verschärft vesikuläres Atmungsgeräusch, Tachykardie (72/min), Anämie (1,66 T/l), Hypoalbuminämie (22,0), LDH- (2245), ASAT- (486) und CK-Aktivitätserhöhung (316 U/l) und verstarb plötzlich. Bei allen Pferden wurde mittels Coggins Testes die EIA diagnostiziert und die Bestände seuchenhygienisch saniert. Vorbeugung: Fliegenkontrolle, Verhinderung iatrogenen Verbreitung, jährliche Testung, Zulassung zu Turnieren mit seronegativem Zeugnis.

1. Einleitung

Die Anämie, ausgelöst durch das Virus der infektiösen Anämie, ist klinisch meist nur bei chronisch infizierten Pferden sichtbar. Dagegen verläuft die Equine Infektiöse Anämie (EIA) laut König und Hoffmann (FLI) (2008) inapparent bei bis zu 90% der Pferde, d. h. ohne offensichtliche klinische Symptome. Dies bedeutet, dass keine blassen oder anämischen Kopfschleimhäute, keine Petechien an Unterzungenfläche, *Margo interalveolaris* oder Nasenflügelfalte nachweisbar sind und Fieber nur rekurrend oder intermittierend auftritt (Beer, 1980). Der entscheidende klinische Hinweis, um eine sofortige serologische Diagnose mit Hilfe des Coggins Testes (Coggins und Norcross, 1970) zu stellen, unterbleibt somit. Leistungsdepression und Fieberschübe treten als einzige klinische Symptome auf und können unbemerkt bleiben, so dass ein infiziertes Pferd zur Infektionsquelle im Bestand bzw. in der Umgebung wird (Mayr, 1984). Als Überträger gelten blutsaugende Insekten auf der Weide (Bremsen, *Tabanus sp.*) und im Stall (Wadenstecher, *Stomoxys calcitrans*). Auch blutverschmierte Instrumente (Nasenbremsen, Nasenschlundsonden, Mundkeile, Zahnraspeln, Endoskope, Striegel, Kardätschen, usw.), transplazentare Übertragung, Injektionsnadeln und Blut- und Plasmatransfusionen sowie illegal erhältliche Plasma- oder Serumprodukte tragen zur Weiterverbreitung der EIA bei (Quinlivan et al., 2007). Primäre Zielzellen des Virus der EIA sind Makrophagen, die mittels Blut oder Sekreten übertragen werden können (Oaks et al., 1998). *Retroviridae* inkludieren die Subfamilie der Lentiviren, zu denen neben dem Virus der EIA das humane Immundefizienzvirus (HIV-1 und -2), feline Immundefizienzvirus (FIV), bovine Immundefizienzvirus (BIV), Affenimmundefizienzvirus (Simian -SIV), Mädi-Visna-Virus sowie das Virus der Arthritis-Enzephalitis der Ziegen (Caprin -CAEV) gehören. Die Überlebensstrategie des Virus der EIA ist, dass es in das Wirtsgenom integriert ist und so nicht mehr durch das wirtseigene Immunsystem eliminiert werden kann. So bleibt ein infiziertes Pferd lebenslanger Virusträger (Sponseller et al., 2007). Weiters entsteht während der inapparenten Form der EIA eine signifikant gesteigerte genetische Variabilität in der Hauptneutralisationsdomäne (principal neutralizing domain - PND) des Virus, wobei diese in der V3 Region der SU lokalisiert ist. Diese genetische Variabilität wird charakterisiert durch eine Größenvariation in V3 und eine Zunahme der Punktmutation in V2 und V4, wobei mit Zunahme der neutralisierenden Antikörper im Wirt während der Infektion ein kontinuierlicher Selektionsdruck in Richtung jener Virusphänotypen mit reduzierter Replikation entsteht. Neutralisierende Antikörper, die als Folge der Infektion mit dem Virus der EIA gebildet werden, verstärken einerseits die Variabilität des Virus und andererseits kontrollieren sie die Replikation des Virus (Sponseller et al., 2007). Klinisch zeigte ein experimentell infiziertes Pony nach Infektion eine biphasische Fieberepisode ($> 38,5^{\circ}\text{C}$) mit Thrombozytopenie ($< 100\text{ G/l}$) (akute Phase), die dann von einer chronischen Phase mit 7 Fieberepisoden von 2 bis 6 Tagen bis zum 135. Tag *post infectionem* (p. i.) abgelöst wurde. Danach folgte eine fieberfreie Periode in der inapparenten Phase mit einem eintägigen Fieber je am 565. und 799. Tag p. i., an denen jeweils eine

Thrombozytopenie auftrat. Virusneutralisierende Antikörper erschienen nach den chronischen Fieberanfällen und blieben über die gesamte inapparente Periode hochtitrig erhalten. Das Pony wurde während der klinisch unauffälligen Periode am 878. Tag p. i. euthanasiert (Sponseller et al., 2007).

In der nachfolgenden Studie wurden klinische und labormedizinische Befunde bei Pferden mit unterschiedlichen Stadien der EIA erhoben.

2. Material und Methoden

Die klinische Untersuchung erfolgte nach dem allgemeinen Untersuchungsgang, wobei ein Pferd in der Medizinischen Tierklinik der Veterinärmedizinischen Fakultät, Universität Leipzig, hospitalisiert war und fünf Pferde eines Reiterhofes untersucht wurden.

Am Untersuchungstag wurden bei allen Pferden Blutproben aus der *Vena jugularis externa* zur hämatologischen, blutchemischen und serologischen Untersuchung genommen. Die hämatologischen (ADVIA 120, Bayer Diagnostic) und blutchemischen (Hitachi 912, Boehringer Mannheim; UV/Vis Spektralphotometer DU 640 B, Beckman Coulter GmbH, Krefeld) Analysen wurden im Labor der Medizinischen Tierklinik durchgeführt. Der serologische Nachweis der Antikörper gegen das Virus der EIA erfolgte mittels Coggins Tests (Coggins und Norcross, 1970) in der Landesuntersuchungsanstalt Leipzig, Sachsen und im Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz, Bad Langensalza, Thüringen. Die letzteren Untersuchungen wurden im FLI, Greifswald, Mecklenburg-Vorpommern (nationales Referenzlabor) kontrolliert.

Die Blutwerte werden als Einzel- und als Minimal-Maximal-Werte angegeben.

3. Ergebnisse

Die hospitalisierte, 5-jährige, im 5. Monat trächtige, braune Kleinpferdstute (1998), die ein Jahr zuvor aus Osteuropa zugekauft wurde, hatte vorberichtlich eine hochgradige Leistungsschwäche, zeigte einen schlechten Ernährungszustand (Abb.1), kühle mittelgradige Ödeme an der Unterbrust und an den Gliedmaßen, porzellanweiße Kopfschleimhäute, Petechien in der Schleimhaut des *Vestibulum vaginae*, eine innere Körpertemperatur von $39,3^{\circ}\text{C}$ und hatte eine Herzfrequenz von 84/min. Die pathologisch anatomischen Befunde entsprachen, wie in der Literatur beschrieben (Beer, 1980). Die klinischen Symptome dieses Pferdes glichen der chronischen Form der EIA.

Der 6-jährige Knabstrupperwallach (2006), der in Thüringen gezogen wurde und mit den anderen vier Warmblutpferden auf demselben Reiterhof gehalten wurde, hatte vorberichtlich kontinuierliches Fieber innerhalb eines Zeitraumes von 12 Tagen zwischen $38,3$ und $41,4^{\circ}\text{C}$, zeigte bei der Untersuchung einen guten Ernährungszustand, war apathisch, inappetent, hatte geringgradige kühle Ödeme an Unterbrust und Hintergliedmaßen, eine Pulsfrequenz zwischen 60 und 72/min, ein verschärft vesikuläres Atmungsgeräusch

und am letzten Tag zeigte das Pferd porzellanweiße Kopfschleimhäute, blutigen Nasenausfluss und verstarb. Pathologisch-anatomisch wurden massenhaft Petechien und Ekchymosen an der Unterzungfläche, in der Backenschleimhaut, subpleural an Lunge und Brustfell, suprapikardial, subkapsulär in der Niere und in der Muskulatur nachgewiesen. Aufgrund des 12-tägigen klinischen Verlaufes, des hohen Fiebers, Nasenblutens, der Tachykardie und der disseminiert vorhandenen Petechien entsprach dies der akuten Form der EIA (Beer, 1980; Gerber, 1997; Sponseller, 1997).

Die vier Warmblutpferde (2006) (Abb. 2) eines Reiterhofes (drei Wallache mit einem Alter von 8, 9 und 10 Jahren und eine Stute mit 8 Jahren; 2002 wurde ein Pferd aus Rumänien zugekauft; alle übrigen stammten aus der Region) hatten einen guten Ernährungszustand (Abb. 1); die Besitzer hatten eine geringe Leistungsminderung und bei drei Pferden ein eintägiges und bei einem ein sechstägiges Fieber zwischen 38,3 und 40,5° C in letzten zwei Wochen festgestellt und die Pferde waren in Außenboxen aufgestellt (Abb. 1). Bei der klinischen Untersuchung war nur 1/4 Pferden apathisch und hatte 40,0° C Fieber. Kein Pferd hatte Ödeme oder eine Tachykardie und nur ein Pferd Petechien im *Margo interalveolaris* der Mundschleimhaut. Die Konjunktiven und die Mundschleimhäute waren blassrosa und eine Gelbfärbung (Ikterus) der Schleimhäute war nicht nachweisbar. Appetit, Harn- und Kotabsatz waren physiologisch. Die klinischen Befunde sprachen für das Vorliegen der inapparenten Form der EIA.



Abb. 1 Kleinpferdstute mit chronischer Form der EIA, Abmagerung und Ödemen an den Gliedmaßen.

Die labormedizinischen Untersuchungsergebnisse aller Pferde sind in den Tabellen 1 und 2 aufgelistet. Die beiden Pferde mit akuter oder chronischer Form zeigten im Erythrogramm eine normozytäre, normochrome Anämie. Die Blutsenkungsreaktion war hochgradig und die Thrombozytopenie geringgradig bei der Kleinpferdstute nachweisbar. Der Nachweis von Antikörpern auf der Erythrozytenoberfläche wurde mittels des direkten Coombs Testes bei der Kleinpferdstute geführt. Beim Wallach mit akuter Form war die Thrombozy-



Abb. 2 In der oberen Reihe und unten links sind je zwei Warmblutpferde mit inapparenter Form der EIA dargestellt; diese waren in Außenboxen aufgestellt, hatten einen guten Ernährungszustand und drei waren ruhig und aufmerksam und hatten einen guten Appetit. Das Pferd oben links war apathisch und hatte bei der klinischen Untersuchung Fieber von 40,0° C. Unten rechts ist ein Petechium am *Margo interalveolaris* (Pfeil) beim fieberhaften Pferd sichtbar.

tenzahl bei der zweiten Untersuchung normal. Zwei von vier Pferden mit inapparenter Form hatten eine geringgradige Anämie (6,5 u. 6,6 T/l). 4/4 Pferde wiesen erhöhte MCHC-Werte auf, wobei nur ein Pferd mit normaler Erythrozytenzahl (7,7 T/l) und Hämoglobinkonzentration (8,8 mmol/l) erhöhtes freies Hämoglobin (2,34 µmol/l) im Plasma hatte, so dass die erhöhten MCHC-Werte auf eine *in vitro* Hämolyse zurückzuführen war. 2/4 Pferden hatten eine Thrombozytopenie (28 und 85 G/l). Nur bei einem Pferd war eine Leukozytose von 13,8 G/l festzustellen. Ein Pferd hatte eine Hypoalbuminämie von 22,7 g/l. Alle vier Pferde hatten erhöhte LDH-Aktivitäten (658 – 3300 U/l). 1/4 und 3/4 hatten erhöhte ASAT- (751 U/l) und CK-Aktivitäten (1081, 604, 484 U/l). Jeweils 1/4 Pferden hatten erhöhte GGT- und GLDH-Aktivitäten von 14,9 und 45 U/l. Die Harnstoff- und Kreatininkonzentrationen waren bei 2/4 (18,4; 6,9 mmol/l) und bei 1/4 (230 µmol/l) erhöht.

Bei allen Pferden wurden mittels Coggins Testes Antikörper im Serum nachgewiesen, somit konnte EIA zweifelsfrei diagnostiziert werden. Die positiven Coggins-Test-Ergebnisse der inapparenten Gruppe und des akut verstorbenen Pferdes wurden im FLI bestätigt. Alle Pferde mit EIA wurden gemäß Tierseuchenrecht (2.7.1975, BGBl. I S. 1845, geändert durch Art. 7 der V vom 23.5.1991, BGBl. I S. 1151) beim Amtstierarzt angezeigt, danach euthanasiert (bei Pferden mit inapparenter Form wurde keine Obduktion durchgeführt), die Aufenthaltsorte gesperrt, Stallungen desinfiziert, 21 Tage nach Entfernung der coggins-test-positiven Pferde wurden zwei im Abstand von vier Wochen serologische Nachkontrollen bei den am Aufenthaltsort befindlichen Pferden durchgeführt, die negativ verliefen, und so konnte die Sperre aufgehoben und die Sanierung erklärt werden.

Tab. 1 Hämatologische Untersuchungsbefunde von Pferden mit inapparenter und chronischer Form der equinen infektiösen Anämie (n. g. = nicht getestet, BSR = Blutsenkungsreaktion nach Westergren).

Parameter	Referenz-bereich	Knabstrupper-wallach mit akuter Form		Kleinpferd-stute mit chronischer Form	Warmblutpferde mit inapparenter Form
		Tag 1	Tag 9	am Unter-suchungstag	am Untersuchungstag
Hk l/l	0,32–0,48	0,25	0,08	0,10	0,26–0,32
Hb mmol/l	6,8–11,8	5,5	1,9	2,30	6,9–8,8
freies HB μ mol/l	0,09–2,01	n. g.	n. g.	n. g.	0,49–2,34
Erythrozyten T/l	6,8–12,9	5,38	1,66	1,55	6,5–7,8
Leukozyten G/l	5,4–10,0	2,9	5,7	5,8	6,0–13,8
segm. Gran. G/l	2,3–8,6	1,5	4,1	n. g.	2,2–9,7
Lymphozyten G/l	1,5–7,7	1,3	1,5	n. g.	2,0–3,2
eos. Granul. G/l	0–1	0,1	0	n. g.	0,1–0,4
Monozyten G/l	0–1	0	0,1	n. g.	0,4–2,0
Thrombozyten G/l	100–600	50	102	98	28–181
MCV fl	37–58	47	47	n. g.	40–41
MCH fmol	0,8–1,2	1,1	1,1	n. g.	1,06–1,13
MCHC mmol/l	19,2–24,0	22	24	n. g.	26,3–27,6
BSR mm nach 15/30 min.	<50/<100	n.g.	n.g.	in 15 min > 170	bei 3 von 4 Pferden beschleunigt
Coombs-Test (direkt)	< 1 : 16	n. g.	n. g.	1 : 64	n. g.

Tab. 2 Blutchemische, serologische und Harnuntersuchungsbefunde von Pferden mit chronischer und inapparenter Form der equinen infektiösen Anämie (n. g. = nicht getestet).

Parameter	Referenz-bereich	Knabstrupper-wallach mit akuter Form		Kleinpferd-stute mit chronischer Form	Pferde mit inapparenter Form
		Tag 1	Tag 9	am Unter-suchungstag	am Untersuchungstag
Totalprotein g/l	52–77	58	n. g.	55,1	63,9–77,3
Albumin g/l	26–37	22	n. g.	16,6	22,7–28,9
Ges-bilirubin μ mol/l	< 45	32,5	n. g.	57	10,3–30,7
LDH U/l	162–412	2245	2832	n. g.	658–3300
ASAT U/l	152–411	486	n. g.	822	272–751
GLDH U/l	< 8	7,4	n. g.	n. g.	2,4–14,9
GGT U/l	11–44	23	n. g.	n. g.	18,8–45
alk. Phosph. U/l	240–475	281	n. g.	n. g.	128–356
CK U/l	92–307	316	309	n. g.	302–1082
Harnstoff mmol/l	3,3–6,7	5,0	n. g.	n. g.	6,1–18,5
Kreatinin μ mol/l	106–159	97	n. g.	n. g.	73–203
anorg. P mmol/l	1,0–1,9	0,4	n. g.	n. g.	n. g.
Gesamt-Ca mmol/l	2,8–3,4	2,5	n. g.	n. g.	n. g.
Coggins Test	negativ	positiv		positiv	bei allen positiv
Harnuntersuchung					
Dichte	1020–1050	n. g.		1011	n. g.
Totalprotein g/l	< 0,33	n. g.		0,4	n. g.

4. Diskussion

Die EIA kommt bei Pferden, Ponys, Maultieren, Mauleseln und Eseln vor und ist weltweit verbreitet und trat 2007 laut WAHID in Europa in Bosnien-Herzegovina, Deutschland, Großbritannien, Italien und Rumänien auf. Gemäß Tierseuchennachrichten der Bundesrepublik Deutschland waren in den Jahren 2006 und 2007 sieben bzw. zwei Fälle registriert worden. Da laut FLI (2008) diese Seuche in Deutschland nicht heimisch ist, müssten aus endemischen Regionen Europas und Übersees

durch Importe infizierter Equiden die EIA eingeschleppt worden sein, um in Deutschland die EIA auszulösen. Von sechs klinisch und labormedizinisch hier untersuchten Pferden hatten vier Befunde der inapparenten Form der EIA. Das klinische Erkennen der inapparenten Form der EIA dieser Pferde bereitete Probleme, da nur vereinzelt Fieberschübe und Petechien sowie keine charakteristischen labormedizinischen Veränderungen auftraten (Menzies und Patterson, 2006). Klinische und labormedizinische Befunde bei Pferden mit EIA wurden in den letzten Jahren nicht beschrieben, weil nach

ätiologischer Diagnose mittels Coggins Tests gemäß Tierseuchenrecht die Tötungen amtlich angeordnet und so weitere Untersuchungen nicht vorgenommen wurden. Das Vorkommen, die Verbreitung, serologische Diagnostik und Sanierungsmaßnahmen standen im Mittelpunkt der wissenschaftlichen Untersuchungen (Böhm, 1975; Bürki et al., 1979; Feiling et al., 1974; Zettl und Primus, 1975). Wichtige Forschungen umfassten die immunbedingte genetische Selektion des Virus während der klinischen Stadien, Vermehrung und Einflüsse des Virus auf Endothelzellen, Thrombozyten und Megakaryozyten sowie die Hämagglutination (Crawford et al., 1996; Brett, Maury et al., 1998; Oaks et al., 1999; Sentsui und Kono, 1987; Tornquist und Crawford, 1997).

Das hohe kontinuierliche Fieber ($\geq 40^\circ \text{C}$) und die anfängliche Thrombozytopenie beim Knabstrupperwallach charakterisierten die akute Form der EIA (Beer, 1980; Gerber, 1997; Sponseller, 1997). Fieber könnte als Folge der massiven, infektions- und virämiebedingten Makrophagentätigkeit entstehen, wodurch eine erhöhte Prostaglandinsynthese entsteht (Oaks et al., 1998). Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) und Wachstumsfaktor- β (TGF- β), die im Zuge der Virämie produziert werden, unterdrücken die Thrombopoese, im Speziellen die Megakaryozyten (Tornquist und Crawford, 1997). Die infizierten Endothelzellen, die neben den Makrophagen zur Virusreplikation beitragen, ändern ihre Zellmembranen und dadurch adhären Thrombozyten, wodurch sich die Anzahl der im Blutstrom befindlichen Thrombozyten reduziert (Oaks et al., 1999). In experimentell infizierten Araberfohlen verkürzte sich die Lebensdauer der Thrombozyten von $4,1 \pm 0,9$ auf $1,3 \pm 0,7$ Tagen (Crawford et al., 1996). Zum Zeitpunkt der Thrombozytopenie verlängerte sich die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (APTT) und erhöhten sich die Fibrinabbauprodukte (Crawford et al., 1996). Aufgrund der Thrombozytopenie und möglicherweise der verlängerten APTT (nicht gemessen bei den hier untersuchten Pferden mit EIA) wären das Nasenbluten und die Petechien beim Pferd mit akuter Form erklärbar. Trotz mittelgradiger Thrombozytopenie bei einem Pferd mit inapparenter Form (28 G/l) waren nur vereinzelt Petechien im *Margo interalveolaris* nachweisbar (Leadon, 2007). Subkutane Ödeme an Unterbrust und Gliedmaßen könnten als Folge von virusbedingten Endothelschäden (Virusreplikation) beim Pferd mit akuter Form und infolge Hypoalbuminämie (16,6 g/l) beim Pferd mit chronischer Form entstehen (Maury et al., 1998). Die porzellanweißen Kopfschleimhäute der Pferde mit akuter und chronischer Form sind ursächlich in der Anämie begründet. Diese ist erklärbar durch die Blutungen (Petechien), Phagozytose der antikörper-viruskomplement-beladenen Erythrozyten (= extravaskuläre Hämolyse), Suppression des Knochenmarkes und durch die Lysis der komplement-virus-beladenen Erythrozyten (= intravaskuläre Hämolyse). Verantwortlich für die hochgradige Hämosiderose in Lymphknoten, Leber, Lunge und Milz beim Pferd mit akuter Form könnte eine massive intravaskuläre Hämolyse gewesen sein (Sentsui und Kono, 1987). Das Pferd mit chronischer Form hatte eine hochgradige und zwei Pferde mit inapparenter Form eine geringgradige Anämie, die durch die Knochenmarksuppression und reduzierte Lebensdauer der Erythrozyten erklärbar wäre (Sentsui und Kono, 1987; Torn-

quist et al., 1997; Uhlig et al., 1999). Die Tachykardie beim Pferd mit akuter Form war aufgrund der systemisch-bedingten Immunantwort und beim Pferd mit chronischer Form aufgrund der Anämie zu begründen.

Die Hypoalbuminämie bei den Pferden mit akuter und chronischer Form war aufgrund der verminderten Synthese aufgrund der Hepatitis (lymphoplasmazelluläre Infiltration, ASAT- und LDH-Aktivitätserhöhung) zurückzuführen. Ein Pferd mit inapparenter Form hatte eine Hypoalbuminämie (22,7 g/l) und gleichzeitig eine Erhöhung der Enzymaktivitäten von ASAT (751 U/l), GGT und GLDH (45, 14,9 U/l), was für eine akute Leberfunktionsstörung (Hepatitis) und Gallengangsschädigung sprach. Die geringe Erhöhung des Gesamtbilirubins beim Pferd mit chronischer Form könnte auf die Hepatitis, intra- und extravaskuläre Hämolyse zurückzuführen sein. Die subepikardialen und Muskelblutungen, entstanden durch Endothelschäden infolge Virusreplikation, verursachen eine Hypoxämie im Muskelgewebe und somit eine Myopathie, so dass eine Aktivitätserhöhung der CK und der LDH beim Pferd mit akuter Form und bei drei Pferden mit inapparenter Form entstand. Die Erythrozytolyse nach erfolgter Blutung im Gewebe und der vorhin erwähnten immunbedingten intra- und extravaskulären Hämolyse könnte Ursachen der LDH-Aktivitätssteigerung sein. Das Pferd mit inapparenter Form hatte sowohl eine Hypoalbuminämie und Leberfunktionsstörung als auch eine Erhöhung des Harnstoffes und des Kreatinins im Serum, was für ein akutes renales Nierenversagen (Glomerulonephritis aufgrund Adhäsion von Immunkomplexen) spricht. Die Isostenurie beim Pferd mit chronischer Form könnte aufgrund der Hypoalbuminämie (verminderter Wasserrückresorption), reduzierter Durchblutung infolge interstitieller Zellinfiltrationen und der Blutungen wegen Endothelschädigungen entstehen. Die Proteinurie war die Folge einer immunkomplexbedingten Glomerulonephritis.

Zusammenfassend muss aus differentialdiagnostischer Sicht hierzulande beim Vorhandensein einer Thrombozytopenie die equine Anaplasmosen während der warmen Jahreszeit berücksichtigt werden. Kontinuierliches, hochgradiges Fieber, porzellanweiße Kopfschleimhäute, blutiger Nasenausfluss und Anämie waren beim Pferd mit akuter Form vorherrschend. Dagegen Abmagerung, porzellanweiße Kopfschleimhäute, jedoch wenig Petechien, Anämie, beschleunigte Blutsenkungsreaktion und Erhöhung der ASAT waren charakteristisch für das Pferd mit chronischer Form. Physiologischer Ernährungsstatus, kurze Fieberepisoden bis über 40°C , selten Petechien, bei 50% eine Thrombozytopenie, bei 75% eine beschleunigte Blutsenkungsreaktion und Erhöhung der Aktivität der CK waren Befunde bei Pferden mit inapparenter Form. Daher gelten eine Kontrolle für zugekaufte Pferde mittels des Coggins Testes und eine Nachkontrolle nach sieben Wochen als sichere Seuchenprophylaxe im Pferdebestand! Fliegen-Kontrolle im Pferdestall, strikte Verhinderung der iatrogenen Verbreitung, jährliche Kontrolle aller Pferde im Pferdebestand und nur Zulassung zu Turnieren von seronegativen Pferden mit maximal 6 monatiger Zeugnisdauer sind seuchenprophylaktische Maßnahmen.

5. Literatur

- Beer, J. (1980) Infektionskrankheiten der Haustiere. Jena, Gustav Fischer Verlag, pp. 173–180.
- Böhm, H. O. (1975) Neuere Ergebnisse bei der Forschung der ansteckenden Blutarmut der Einhufer. *Tierärztl Praxis* 3:323–330.
- Bürki, F., Kasper, A. und Zach, E. (1979) Sanierung eines regionalen Ausbruches Equiner Infektiöser Anämie. *Wien. Tierärztl Mschr* 66:3–7.
- Coggins, L. und Norcross, N. L. (1970) Immundiffusion reaction in equine infectious anemia. *Cornell Veterinarian* 60:330–335.
- Crawford, T. B., Wardrop, K. J., Tornquist, S. J., Reilich, E., Meyers, K. M. und McGuire, T. C. (1996) A primary production deficit in the thrombocytopenia of equine infectious anemia. *J Virol* 70:7842–7850.
- Feiling, O., Heun, E., Primus, K. und Zettl, K. (1974) Beobachtungen anlässlich eines Seuchenausbruchs der „Ansteckenden Blutarmut der Einhufer“ im Raum Kassel. *Dtsch Tierärztl Wschr* 81:237–241.
- Gerber, H. (1997) Equine infektiöse Anämie. In: Wintzer, H.-J. (ed.) *Krankheiten des Pferdes*. Berlin, Parey Buchverlag, pp. 543–546.
- König, P. und Hoffmann, L. (2008) Equine Infektiöse Anämie. Friedrich-Loeffler-Institut, <http://www.fli.bund.de/1354.html>, 29.3.2008.
- Leadon, D. P. (2007) Clinical pathology of EIA. 2nd ECEIM Congress, Ireland.
- Maury, W., Oaks, J. L. und Bradley, S. (1998) Equine endothelial cells support productive infection of equine infectious anemia virus. *J Virol* 72:9291–9297.
- Menzies, F. und Patterson, T. (2006) Description of the first case of equine infectious anemia in Northern Ireland. *Vet Rec* 159:753–754.
- Oaks, J. L., McGuire, T. C., Ulibarri, C. und Crawford, T. B. (1998) Equine infectious anemia virus is found in tissue macrophages during subclinical infection. *J Virol* 72:7263–7269.
- Oaks, J. L., Ulibarri, C. und Crawford, T. B. (1999) Endothelial cell infection *in vivo* by equine infectious anemia virus. *J Gen Virol* 80:2393–2397.
- Quinlivan, M., Cook, R. F. und Cullinane, A. (2007) Real-time quantitative RT-PCR and PCR assays for a novel European field isolate of equine infectious anemia virus based on sequence determination of the *gag* gene. *Vet Rec* 160:611–618.
- Mayr, A. (1984) Infektiöse Anämie der Pferde. In: Mayr, A. (ed.) *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. Stuttgart. Enke-Verlag, pp. 592–596.
- Sentsui, H. und Kono, Y. (1987) Complement-mediated hemolysis of horse erythrocytes treated with equine infectious anemia virus. *Arch Virol* 95:53–66.
- Sponseller, B. A. (1997) Equine infectious anemia. In: Robinson, N. E. (ed.) *Current therapy in equine medicine*. Philadelphia, Saunders, pp. 45–47.
- Sponseller, B. A., Sparks, W. O., Wannemuehler, Y., Antons, A. K., Oaks, J. L. und Carpenter, S. (2007) Immune selection of equine infectious anemia virus *env* variants during the long-term inapparent stage of disease. *Virology* 363:156–165.
- Tornquist, S. J., und Crawford, T. B. (1997) Suppression of megakaryocyte colony growth by plasma from foals infected with equine infectious anemia virus. *Blood* 90:2357–2363.
- Uhlig, A., Schusser, G. F., Paul, W., Schiefer, G. und Drachenberg, A. (1999) Infektiöse Anämie beim Pferd – Aktueller Seuchenfall. 23. DVG-Kongress, Bad Nauheim, Teil 2, pp. 393–396.
- WAHID (2007) Equine infectious anemia: List of countries by disease situation. http://www.oie.int/wahid-prod/public.php?page=disease_status_lists, 27.3.2008.
- Zettl, K. und Primus, K. (1975) Aspekte zur Seuchensituation der „Ansteckenden Blutarmut der Einhufer (AB)“. *Dtsch Tierärztl Wschr* 82:301–306.

To access this journal online:
<http://www.birkhauser.ch/JVL>

2.4 Publikation 4: Klinik und labormedizinische Befunde bei Pferden mit equiner granulozytärer Ehrlichiose

Publiziert in Pferdeheilkunde. 2007; 23: 351-6.

Klinik und labormedizinische Befunde bei Pferden mit equiner granulozytärer Ehrlichiose

Gerald Fritz Schusser¹, Astrid Grosche¹, Win Ohnmar Kyaw¹, Marc Kölbl¹, Stephan Recknagel¹, Albrecht Uhlig¹ und Pamela Beelitz²

Medizinische Tierklinik, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig¹ und Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie, Tierärztliche Fakultät, Ludwig Maximilians Universität München²

„Herrn Univ. Prof. Dr. Dr. h.c. Wilfried Kraft zum 70. Geburtstag gewidmet“

Zusammenfassung

Die Diagnose equine granulozytäre Ehrlichiose bei einer einjährigen Friesenstute und zwei 18jährigen Stuten wurde mittels Blutaussstriches aufgrund der Morula in stabkernigen neutrophilen Granulozyten gestellt. Die ätiologische Diagnose *Anaplasma phagocytophilum*-Infektion wurde mittels IFAT und PCR bestätigt. *Ixodes ricinus* wurde an der Hautoberfläche gefunden. Die Symptome waren Apathie, Unterbrustödem (1/3), Fieber (1/3), Ikterus (2/3), blassanämische Kopfschleimhäute (1/3), Tachycardie (1/3), verschärft vesikuläres Atmungsgeräusch (2/3), Petechien oder Ekchymosen (2/3) und kaffeebrauner Harn (1/3). Labormedizinische Befunde waren Anämie (2/3), beschleunigte Blutsenkung (2/3), Leukozytose (1/3), Thrombozytopenie (3/3), Hypoalbuminämie (1/3), Fibrinogenämie (2/3), Azotämie (1/3) und verlängerte Thromboplastinzeit sowie aktivierte partielle Thromboplastinzeit (1/3). Als Komplikationen waren bei der jungen Stute akutes renales Nierenversagen, Pneumonie und Hufrehe aufgetreten. Oxytetracyclin wurde bei allen Patienten in der Dosis von 7 mg/kg KM zweimal pro Tag i. v. eingesetzt und die älteren Stuten wurden nach sieben Tagen entlassen. Die junge Stute wurde intensivmedizinisch versorgt, so dass sie trotz einer Darmbeinfraktur nach sieben Monaten entlassen werden konnte. Laut serologischen Untersuchungen ist die Verbreitung in der Herkunftsregion bei klinisch unauffälligen Pferden zurzeit zwischen 26 und 33%.

Schlüsselwörter: *Anaplasma phagocytophilum*, Symptome, Laborbefunde, Pferd

Clinical signs and clinical pathology of horses with equine granulocytic ehrlichiosis

The diagnosis equine granulocytic Ehrlichiosis was made on a one year old Friesen mare and on two 18-year old mares by blood smears due to the morula in bands. The etiologic diagnosis *Anaplasma phagocytophilum* infection was found using IFAT and the evidence of the genomic DNA was confirmed by nested PCR. *Ixodes ricinus* was found on the surface of the skin in all patients. The symptoms were depression (3/3), partial loss of appetite (3/3), edema on the lower chest (1/3), fever (1/3), icterus (2/3), pale mucous membranes (1/3), tachycardia (1/3), abnormal lung sounds (2/3), petechia, ecchymoses (2/3), and brown ("like a coffee") urine (1/3). The clinical pathological data were anaemia (2/3), increased erythrocyte sedimentation rate (2/3), leukocytosis (1/3), thrombocytopenia (3/3), hypoalbuminemia (1/3), fibrinogenemia (2/3), azotemia (1/3) and prolonged prothrombin and activated partial thromboplastin time (1/3). Complications appeared in the young mare such as acute renal failure, pneumonia and laminitis. Oxytetracycline was used as an antibiotic of choice with a dosage of 7 mg/kg b.w. bid intravenously until the thrombocytes were in normal range. The older mares have been discharged after seven days. The young mare has been looked after providing intensive medical care so she could be released after seven months despite suffering on a fracture of the iliac bone. Seroepidemiologic surveys of horses where the patients came from have shown between 26 and 33% prevalence.

Keywords: *Anaplasma phagocytophilum*, horse, clinical symptoms, clinical pathological data, Germany

Einleitung

Die equine granulozytäre Ehrlichiose, erstmals beschrieben 1969 in Kalifornien (Stannard et al. 1969), ist eine von Zecken übertragene Infektionskrankheit. Der Erreger, obligat intrazellulär in neutrophilen Granulozyten, umfasst aufgrund gemeinsamer Antigene und biologischer Charakteristika *Ehrlichia phagocytophila*, *Ehrlichia equi* und das Agens der humanen granulozytären Ehrlichiose (HGE). Diese drei Erreger, basierend auf Genanalysen, sind heute zu einer einzigen Spezies als *Anaplasma phagocytophilum* zusammengefasst und charakterisiert, die zur Ordnung der Rickettsiales gehört (Dumler et al. 2001). Rickettsieninfektionen bei Haustieren einschließlich Pferden wurden in Deutschland 1982 bzw. 1987 beschrieben, wobei der Nachweis mittels Blutaussstriches geführt wurde (Friedhoff 1982, Bücher et al. 1984, Gerhards et al. 1987). *Anaplasma phagocytophilum* wurde in Zecken der Spezies *Ixodes ricinus* mittels PCR bei 1,9 bis 4,5% der gesammelten Zecken in Süddeutschland nachgewiesen (Hartelt et al. 2004, Leonhard 2005). *Ixodes scapularis* wurde als

Vektor zur Übertragung von *Anaplasma phagocytophilum* (humane granulozytäre Ehrlichiose) benutzt, um die Krankheit beim Pferd experimentell auszulösen (Pusterla et al. 2002). Als Reservoir gelten Wildnager, Hirsche, Schafe, Rinder und Pferde, wobei als Vektoren für die Übertragung auf den Menschen in den USA *Ixodes scapularis* und *Ixodes pacificus*, in Europa *Ixodes ricinus* angesehen werden (Ogden et al. 1998). *Anaplasma phagocytophilum* wird in Deutschland auch bei Hunden nachgewiesen. Das Vorkommen dieser Infektionskrankheit wurde in den USA, Großbritannien (Korbutiak and Schneiders 1994), Frankreich (Leblond et al. 2005), Italien (Lillini et al. 2006), Schweden (Pringle 2004), Schweiz (Hermann et al. 1985, Pusterla et al. 1998), Spanien (Amusatogui et al. 2006) und Israel (Levi et al. 2006) bestätigt. In Deutschland wurde bei einem Pferd mittels PCR im Blut *Anaplasma phagocytophilum* nachgewiesen (von Loewenich et al. 2003). Beim Pferd werden Apathie, Fieber, Ödeme, Ikterus, Ataxie, Anämie, Leukopenie, Thrombozytopenie und Hyperbilirubinämie beschrieben (Gribble 1969). Die klinischen und labormedizinischen Unterschiede zwischen experimenteller und Feldinfektion

gaben Anlass zur nachfolgenden Darstellung dieser Patienten, die in die Medizinische Tierklinik, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig eingeliefert wurden.

Klinische und labormedizinische Befunde sowie Diagnose

Eine einjährige Friesenstute im Juni 2005, eine 18jährige Warmblutstute im Juli 2006 und eine 18jährige Traberstute im Mai 2007 wurden wegen Apathie und blutig-schleimigen Nasenausflusses, Apathie und Fiebers bis 40,5° C sowie wegen Ikterus in die Klinik eingewiesen. Die Krankheitsdauer betrug ein bis drei Tage. Die klinischen Befunde bei der Aufnahme sind in Tabelle 1 dargestellt. Eine Besonderheit der Friesenstute waren die Ekchymosen in der Vestibulumschleimhaut (Abb. 1). Die labormedizinischen Ergebnisse sind in Tabelle 2 aufgelistet. Die hämatologischen und klinisch chemischen Parameter wurden mit dem hämatologischen Messsystem ADVIA® 120 (Fa. Bayer Diagnostics, Fernwald) bzw. Hitachi 912 (Fa. Roche Diagnostics GmbH, 68305 Mannheim) durchgeführt. Zecken der Spezies *Ixodes ricinus* wurden bei der Friesenstute am zahlreichsten, bei den älteren Stuten in geringerer Zahl gefunden und entfernt. Die Friesenstute hatte weiters eine metabolische Azidose. Der Harn war kaffeebraun und hatte

eine Dichte von 1012 (Referenzbereich: 1020-1050), einen pH-Wert von 5,2 (Referenzbereich: 7,5-8,5), eine hochgradige Eiweißkonzentration und ein GGT-Kreatinin-Verhältnis von 208 U/mg (Referenzbereich: <25). Der Säure-Basen-Haushalt der Warmblut- und Traberstute war im Referenzbereich. Die Diagnose „equine granulozytäre Ehrlichiose“ konnte bei allen Stuten aufgrund der basophilen Einschlüsse (Morula) in den stabkernigen neutrophilen Granulozyten im Blutaussstrich (Diff-



Abb 1 Ekchymosen in der Vestibulumschleimhaut der einjährigen Friesenstute bei Aufnahme in die Klinik.

Ecchymoses of the mucosa in Vestibulum vaginae of the one year old Friesen mare at admission.

Tab 1 Klinische Befunde der drei Pferde mit *Anaplasma phagocytophilum* – Infektion bei Aufnahme in die Medizinische Tierklinik.
Clinical findings of three horses with Anaplasma phagocytophilum infection at admission in the horse hospital.

	Einjährige Friesenstute	18jährige Warmblutstute	18jährige Traberstute
Allgemeinverhalten	apathisch	apathisch	apathisch
Ernährungszustand	mittelgut	gut	mittelgut
Haarkleid	büschelweise Deck- und Langhaar ausziehbar	mittelgradig verschwitzt	struppig
	geringgradig kühles Ödem an den Beinen bis Karpal-/Sprunggelenk und an Unterbrust, zahlreiche Exkoriationen am Kopf, 80 Zecken (<i>Ixodes ricinus</i>)	ohne Besonderheiten, wenige Zecken (<i>Ixodes ricinus</i>)	ohne Besonderheiten, mehrere Zecken (<i>Ixodes ricinus</i>)
Hautoberfläche			
Hautelastizität	mittelgradig vermindert	erhalten	erhalten
Innere Körpertemperatur	37,3° C	38,5° C	37,8° C
Konjunktiva	blassanämisch	blassrosa, ikterisch	blassrosa, mittelgradig ikterisch
Nasenschleimhaut	blassrosa, mittelgradig blutig schleimiger Ausfluss	rosarot	rosarot, mittelgradig ikterisch, zahlreiche Petechien in der Nasenflügelfalte
Mundschleimhaut	blassanämisch KFZ 3 sec	blassrosa, ikterisch, KFZ <3 sec	blassrosa, mittelgradig ikterisch, KFZ 3 sec
obere Halsgegend	kein Husten auslösbar	kein Husten auslösbar	kein Husten auslösbar
Blutangebot	mittelgradig verzögert	prompt	prompt
Lnn. mandibulares	vergrößert, gelappt, verschieblich, nicht schmerzhaft	gelappt, verschieblich, nicht schmerzhaft	gelappt, verschieblich, nicht schmerzhaft
Pulsfrequenz in min	68	44	36
Atmungsfrequenz in min	20	14	24
Auskultation der Lunge	verschärft vesikuläres Atmungsgeräusch	vesikuläres Atmungsgeräusch	verschärft vesikuläres Atmungsgeräusch
Auskultation des Herzens	pochend	Herztöne gut abgesetzt	Herztöne gut abgesetzt
Abdomen	verminderte Peristaltik	verminderte Peristaltik	verminderte Peristaltik
Genitale	zahlreiche Ekchymosen in Vestibulumschleimhaut	keine	keine
Kot und Harn	geballt; kaffeebraune Farbe des Harnes	geballt; strohgelb, schleimig	geballt; strohgelb, schleimig

Tab 2 Labormedizinische Befunde der drei Pferde mit *Anaplasma phagocytophilum* – Infektion bei Aufnahme in die Medizinische Tierklinik. Im Immunofluoreszenzantikörpertest (IFAT) wurden spezifische Antikörpertiter im Serum der Patienten gegenüber *Anaplasma phagocytophilum* (An. ph.) gemessen. Die DNA von *Anaplasma phagocytophilum* wurde mittels PCR nachgewiesen.

Clinical pathological findings of three patients with Anaplasma phagocytophilum infection at admission. The immunofluoreszenz antibody test (IFAT) was used for measuring the antibody titer in the serum samples. Anaplasma phagocytophilum DNA was detected by PCR.

Parameter	Referenzbereich	Einjährige Friesenstute	18jährige Warmblutstute	18jährige Traberstute
Erythrozyten T/l	6,8-12,9	6,45	6,9	5,5
Hämoglobin mmol/l	6,8-11,8	6,1	7,8	5,9
freies Hämoglobin μ mol/l	0,09-2,01	-	0,19	0,26
Hämatokrit l/l	0,32-0,48	0,25	0,30	0,25
MCV fl	37-58	38,2	43	45
MCH fmol	0,8-1,2	0,95	1,13	1,1
MCHC mmol/l	19,2-24,0	24,7	26,3	23,7
Blutsenkungsreaktion mm	bis 60/ bis 110	90/150	76/132	41/92
Thrombozyten G/l	100-600	32	67	46
Leukozyten G/l	5,4-10,0	47,1	9,2	6,8
stabk. neutr. Gr. G/l	0-0,1	21,2	0,4	0,1
segm.neutr. Gr. G/l	2,3-8,6	9,4	5,7	4,2
Lymphozyten G/l	1,5-7,7	11,3	2,4	1,8
Monozyten G/l	0-0,1	5,2	0,7	0,7
Gesamteiweiß g/l	52-77	58,9	74,5	60,2
Albumin g/l	26-37	20,8	28,3	28,2
ges. Bilirubin μ mol/l	0-45	48,8	146	109
Harnstoff mmol/l	3,3-6,7	26,3	6,1	5,6
Kreatinin μ mol/l	106-159	798	121	97
Glukose mmol/l	3,1-5,3	3,0	8,4	7,0
Triglyzeride mmol/l	<0,6	4,4	-	0,4
alk. Phosphatase U/l	240-475	1879	154	171
AST U/l	153-411	320	226	-
GGT U/l	11-44	60	15	68
GLDH U/l	<8	6	1	1
LDH U/l	162-412	1174	270	388
CK U/l	92-307	74	141	121
Na mmol/l	132-146	126	131	133
K mmol/l	2,4-4,7	4,1	2,9	3,5
Cl mmol/l	99-105	81	100	103
Anorg. Ph mmol/l	1,0-1,9	1,5	0,6	-
Ges. Ca mmol/l	2,5-3,4	3,0	2,7	-
Thromboplastinzeit sec	7-9	29	14,2	-
Thrombinzeit sec	17-21	21	16,9	-
Aktivierte partielle Thromboplastinzeit sec	37-54	72	38,9	-
Fibrinogen g/l	2-4	8,2	5,0	-
IFAT A.ph.		1:512	1:2048	> 256
PCR A.ph.		positiv	-	-

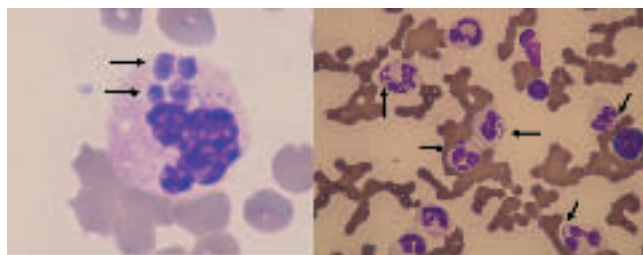


Abb 2 Morula (Pfeil) in stabkernigen neutrophilen Granulozyten im Blutaussstrich der einjährigen Friesenstute, (links 1000x, rechts 400x).

Bands with inclusions (morula) (arrow) seen in the blood smear of an one year old Friesen mare at admission (left 1000x, right 400x).

Quik®, Medion Diagnostics GmbH, Düringen, Schweiz) gestellt werden. Bei der Friesenstute hatten 25 – 30 % der stabkernigen neutrophilen Granulozyten bis zu vier Morula inkorporiert. Die beiden anderen Stuten hatten zahlenmäßig weniger stabkernige neutrophile Granulozyten mit Einschlüssen (Abb 2). Die ätiologische Diagnose „*Anaplasma phagocytophilum* – Infektion“ wurde anhand des Antikörpertiters im Immunofluoreszenz-Antikörper-Test (IFAT) und des DNA-Nachweises mittels PCR gestellt (Pusterla et al. 2002) (Tab 2).

Therapie und klinischer Verlauf

Oxytetracyclin wurde in einer Dosis von 7 mg/kg KM zweimal pro Tag i.v. verabreicht. Die Applikationsdauer war bei den

älteren Stuten sechs bzw. sieben Tage, wobei als Maß die Rückkehr der Thrombozytenzahl in den Referenzbereich galt. Metamizol und Vitamin C in der Dosierung von 20 bzw. 10 mg/kg KM i.v. wurden zweimal pro Tag über den gleichen Zeitraum verabreicht. In dieser Zeit normalisierten sich sowohl die klinisch pathologischen Befunde als auch die Blutparameter. Drei bis vier Tage nach Beginn der Therapie mit Oxytetracyclin waren die Morula in den neutrophilen Granulozyten im Blutausschlag nicht mehr nachweisbar. Die beiden älteren Stuten konnten danach geheilt entlassen werden. Die Warmblutstute hatte vier Monate später noch immer einen IFAT-Titer von 1:1024.

Die Friesenstute wurde infolge der Dehydratation mit Vollelektrolytlösung und aufgrund der verminderten Futteraufnahme mit 1000 g Glukose in 20%iger Lösung in einer Gesamtmenge von 60 ml/kg KM/d in den ersten drei Tagen nach Aufnahme partiell parenteral ernährt. Die metabolische Azidose wurde mit isotoner Natriumbikarbonatlösung korrigiert. Da die Futter- und Wasseraufnahme am vierten Tag nach Aufnahme sistierte, wurde eine total parenterale Ernährung über drei Tage angeschlossen mit 140 kJ/kg KM im Energieverhältnis von 70 Glukose- und 30 Lipidanteilen. Eiweiß wurde in der Menge von 1 g/kg KM in Form von Aminosäuren in die Ernährungslösung inkludiert und intravenös über einen Venenkatheter infundiert. Die Stoffwechselprodukte Glukose und Triglyzeride wurden kontrolliert und blieben im tolerierbaren Bereich von <11 bzw. <1,7 mmol/l (Schusser 1994). Danach entwickelte sich ein mäßiger Appetit.

Die Behandlung wurde mit 1,1 mg Flunixin meglum/kg und 20 mg Vitamin C/kg KM i.v. komplettiert. Aufgrund der verlängerten Zeiten der globalen Gerinnungstests, die für disseminierte intravaskuläre Koagulopathie sprechen, wurde Heparin in einer Dosis von 100 I.E./d s.c. über 4 Tage vom dritten bis zum siebenten Tag nach der Aufnahme verabreicht. Die Thrombozytenzahl verminderte sich bei der Friesenstute am zweiten Tag des Klinikaufenthaltes auf 23 G/l und die innere Körpertemperatur stieg auf 39,4° C, wobei die Thrombozytenzahl am fünften Tag nach Therapiebeginn im Referenzbereich lag. Die innere Körpertemperatur stieg unregelmäßig bis auf 38,9° C an und normalisierte sich erst in den folgenden drei Monaten. Die Puls- und Atemfrequenz bewegte sich zwischen 60 und 80 bzw. 16 und 44 pro Minute während des oben genannten Zeitraumes. Am achten Tag nach der Aufnahme traten beidseitiger mittelgradig eitriges Nasenausfluss, Dyspnoe, stoßweiser Husten und ein bronchiales Atemgeräusch über der Lunge auf, was für eine Pneumonie sprach. Als weitere schwerwiegende Komplikation entwickelte sich eine hochgradige Hufrehe an allen vier Gliedmaßen, so dass die Stute zum Festliegen kam. Die Hufrehe wurde mit Hufgipsen und gepolsterten Verbänden bis zum Sprunggelenk und Karpalgelenk unterstützend behandelt. Durch das vermehrte Liegen entstanden Dekubitalstellen in den Bereichen Olekranon, Hüftgelenk und Hüftgelenk, die mit adhäsiven Wattenverbänden geschützt wurden. Die Erythrozytenzahl (3,6 T/l) und der Hämatokrit (0,14 l/l) erreichten den niedrigsten und die Leukozyten den höchsten Wert (33,8 G/l) am 17. Tag der Hospitalisation. Das Gesamteiweiß und die Albuminkonzentration lagen bei 53,5 g/l und 18,1 g/l. Eine Bluttransfusion eines im Kreuztest verträglichen Donors wurde einmal in der Menge von 3,5 l durchgeführt. Die Antibiotika Enrofloxacin (2,0 mg/kg KM) und Gentamicin (6,6 mg/kg KM) wurden

i.v. einmal pro Tag über 16 Tage gegeben. Während dieser Krankheitsdauer wurden Vitamine und Spurenelemente p.o. jeden zweiten Tag ins Futter beigemischt. Die Dekubitalstellen waren nach zwei Monaten verheilt. Vier Monate nach Beginn der Erkrankung erlitt die Stute eine Fraktur des rechten Darmbeines. Die akute Hufrehe verursachte eine Loslösung der Hufseitenwände. Nach sechs Monaten waren alle vier Hufe wieder mit normalem Hufhorn ausgebildet und die Stute konnte alle vier Hufe belasten. Die Fraktur des Darmbeines war sieben Monate danach dementsprechend geheilt, so dass die rechte Hintergliedmaße belastbar war.

Diskussion

Die Anamnese war gekennzeichnet durch Fieber und Apathie. Die Krankheitsdauer zum Zeitpunkt der Aufnahme in die Klinik betrug ein bis drei Tage, wobei die Inkubationszeit nach experimenteller Infektion mit 11 bzw. 6 bis 9 Tagen angegeben wird und die ersten Krankheitssymptome Fieber und Apathie waren (Pusterla et al. 2002, Franzén et al. 2005). Das Vorkommen und der Grad der Ödeme an Unterbrust und an den Gliedmaßen bei Patienten hängt möglicherweise von der Infektionsdosis ab, so wie dies im Experiment gezeigt wurde (Franzén et al. 2005). Die jüngste Stute mit den hochgradigen klinischen Befunden hatte die höchste Anzahl von Zecken. Auch die weiteren höhergradigen klinischen Symptome, wie Inappetenz, erhöhte Atmungs- und Herzfrequenz, Ikterus und Petechien sowie Pneumonie und Hufrehe als Komplikation könnten die Folge dieser erhöhten Infektionsdosis sein. Als Ausdruck der systemischen Infektion der granulozytären Ehrlichiose und somit der systemischen Entzündung (systemic inflammatory response syndrome = SIRS) kann die beschleunigte Blutsenkungsreaktion und die erhöhte Fibrinogenkonzentration angesehen werden. Alle Patienten wiesen weder eine Neutro- noch eine Lymphopenie auf. Im Gegensatz zu den experimentellen Ergebnissen hatte die schwer kranke junge Stute eine massive Leukozytose mit Linksverschiebung (Pusterla et al. 2002, Franzén et al. 2005). Die festgestellte Thrombozytopenie der Patienten war ähnlich wie in den vorhin genannten Studien, jedoch mit maximal sieben Tagen deutlich kürzer. Die Thrombozytopenie der experimentell infizierten Pferde dauerte über zehn Tage vom neunten bis 19. Tag post infectionem (Franzén et al. 2005). Die geringgradige normozytäre Anämie mit erhöhtem MCHC bei zwei Pferden wies auf eine intravaskuläre Hämolyse hin, wobei aber bei zwei Pferden keine erhöhte Konzentration von freiem Hämoglobin im Plasma messbar war. Auch in den experimentellen Studien war nur ein aus drei Pferden anämisch (Pusterla et al. 2002). Die Anämie könnte die Folge des septikämischen Verlaufes (SIRS) mit Fieber, Petechien, Ödem, Thrombozytopenie und verlängerten globalen Gerinnungszeiten sein. Auch beim experimentell infizierten und gestorbenen Pferd waren pathologisch-anatomisch zahlreiche Petechien und Ekchymosen in der Nasenschleimhaut und in den Sinus sowie massive Blutungen in der Subkutis, Muskulatur, Lunge, im Mediastinum, in Pleura, Peritoneum, Leber, Milz und in den Nieren festgestellt worden. Der blutig schleimige Nasenausfluss der jungen Stute stammte aus den intramuralen Blutungen der Lunge. Die bei den meisten experimentell infizierten Pferden und bei Patienten mit Ehrlichiose nachgewiesene Thrombozytopenie und festgestellten verlängerten Gerinnungszeiten sind Ausdruck einer disseminierten intravaskulären Koagulopathie (Franzén et al. 2007).

Die Hypoalbuminämie und Erhöhung von Harnstoff und Kreatinin im Serum und des sehr hohen GGT-Kreatinin-Verhältnisses im Harn sowie der Isosthenurie der jüngsten Stute sind Zeichen eines akuten renalen Nierenversagens infolge einer Glomerulotubulonephritis (Franzén et al. 2007). Die erhöhte Bilirubinkonzentration könnte einerseits durch Inappetenz (Inanitionsikterus) und andererseits durch die massiven Blutungen in den Organen erklärbar sein. Eine intravaskuläre Hämolyse war auszuschließen, weil keine Erhöhung der freien Hämoglobinkonzentration im Plasma nachweisbar war. Die Aktivitätssteigerung der LDH könnte aufgrund der zahlreichen Blutungen in der Lunge und möglicherweise in den anderen Organen hervorgerufen worden sein. Die hohen Aktivitäten der ALP und weniger hohen der GGT könnten von der Leber und Niere stammen, weil beim gestorbenen Pferd infolge Ehrlichiose eine interstitielle Nephritis und eine Infiltration von Entzündungszellen in den Sinusoiden der Leber nachweisbar waren. Auch der kaffeebraune Harn der jungen Stute könnte von Nierenblutungen stammen, weil nekrotisierende Arterien- und Kapillarenwände beim gestorbenen Pferd mit Ehrlichiainfektion gefunden wurden (Franzén et al. 2007). Die Hufrehe einer Patientestute war auf den schweren septikämischen Verlauf der Ehrlichiose zurückzuführen. Die Diagnose equine granulozytäre Ehrlichiose wurde bei allen Patienten mittels Blutaussstriches gestellt, die wohl die schnellste Methode darstellt. Der Nachweis von Serumantikörpern mit Hilfe des IFATs und die Präsenz der genomischen DNA von *Anaplasma phagocytophilum* in der PCR bestätigten die Diagnose. Die beste Wirksamkeit der Antibiotika auf *Anaplasma phagocytophilum* (Stamm aus Kalifornien) haben Doxycyclin und Rifampin (Maurin et al. 2003). Der verzögerte Heilungsverlauf und die schweren Komplikationen Hufrehe und Pneumonie könnten die Mineralisation des Knochens beeinflusst und Risikofaktoren für die Darmbeinfraktur dargestellt haben (Maurin et al. 2003). Aufgrund der experimentellen Studien ist die Morbidität bei Pferden sehr hoch, die mit 100% und 66% zu beziffern wäre (Pusterla et al. 2002, Franzén et al. 2005). Die Mortalität dagegen ist gering (Franzén et al. 2007). Aufgrund einer serologischen Surveillance, die zur Zeit noch im Gange ist, wurden bei 26 bis 33% der klinisch unauffälligen Pferde sehr hohe IFA-Titer im Herkunftsgebiet nachgewiesen, daher sind Verbreitungsregionen der Zecken mögliche Gefährdungsgebiete für Weidepferde.

Literatur

- Amusatogui I., Sainz A. und Tesouro M. A. (2006): Serological evaluation of *Anaplasma phagocytophilum* infection in livestock in northwestern Spain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1078, 487-90
- Bücher G., Gandras R., Apel G. und Friedhoff K. T. (1984): Der erste Fall von Ehrlichiose beim Pferd in Deutschland. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 91, 408-409
- Dumler J. S., Barbet A. F., Bekker C. P. J., Dasch G. A., Palmer G. H., Ray S. C., Rikihisa Y. und Rurangirwa F. R. (2001): Reorganization of genera in the families Rickettsia and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, description of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi phagocytophila. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 2145-2165
- Franzén P., Aspan A., Egenvall A., Gunnarsson A., Aberg L. und Pringle J. (2005): Acute clinical, hematologic, serologic, and polymerase chain reaction findings in horses experimentally infected with a European strain of *Anaplasma phagocytophilum*. *J. Vet. Intern. Med.* 19, 232-239
- Franzén P., Berg A. L., Aspan A., Gunnarsson A. and Pringle J. (2007): Death of a horse infected experimentally with *Anaplasma phagocytophilum*. *Vet. Rec.* 160, 122-125
- Friedhoff K. T. (1982): Rickettsieninfektionen (Ehrlichia, Eperythrozoon, Haemobartonella) bei Haustieren in Deutschland. *Fortschritte Vet. Med. Beihefte Zentralbl. Veterinärmed.* 35, 204-209
- Gerhards H., Offeney F. und Friedhoff K. T. (1987): Ehrlichia-Infektion beim Pferd. *Pferdeheilkunde* 3, 283-291
- Gribble D. H. (1969): Equine Ehrlichiosis. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 155, 462-469
- Hartelt K., Oehme R., Frank H., Brockmann S. O., Hassler D. und Kimmig P. (2004): Pathogens and symbionts in ticks: prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* (Ehrlichia sp.), *Wolbachia* sp., *Rickettsia* sp., and *Babesia* sp. in Southern Germany. *Int. J. Med. Microbiol.* 293 Suppl 37, 86-92
- Hermann M., Baumann D., Lutz H. und Wild P. (1985): Erster diagnostizierter Fall von equiner Ehrlichiose in der Schweiz. *Pferdeheilkunde* 1, 247-250
- Jensen J., Simon D., Schaarschmidt-Kiener D., Müller W. und Nolte I. (2007): Vorkommen von Ehrlichia canis bei Hunden in Deutschland? *Tierärztl. Prax.* 35, 123-128
- Korbutiak E. und Schneiders D. (1994): Equine granulocytic ehrlichiosis in the UK. *Vet. Rec.* 135, 387-388
- Leblond A., Pradier S., Pitel P. H., Fortier G., Boireau P., Chadoeuf J. und Sabatier P. (2005): An epidemiological survey of equine anaplasmosis (*Anaplasma phagocytophilum*) in southern France. *Rev. Sci. Tech.* 24, 899-908
- Levi O., Waner T., Baneth G., Keysary A., Bruchim Y., Silverman J. und Harrus S. (2006): Seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum* among healthy dogs and horses in Israel. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health.* 53, 78-80
- Lillini E., Macri G., Proietti G. und Scarpulla M. (2006): New findings on anaplasmosis caused by infection with *Anaplasma phagocytophilum*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1081, 360-370
- Maurin M., Bakken J. S. und Dumler J. S. (2003): Antibiotic susceptibilities of *Anaplasma* (Ehrlichia) phagocytophilum strains from various geographic areas in the United States. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 47, 413-415
- Ogden N. H., Woldehiwet Z. and Hart C. A. (1998): Granulocytic ehrlichiosis: an emerging or rediscovered tick-borne disease? *J. Med. Microbiol.* 47, 475-482
- Pringle J. (2004): Equine granulocytic ehrlichiosis: European perspective. *Tierärztl. Prax.* 32 (G), 89
- Pusterla N., Huder J. B., Feige K. und Lutz H. (1998): Identification of a granulocytic Ehrlichia strain isolated from a horse in Switzerland and comparison with other rickettsiae of the Ehrlichia phagocytophila genogroup. *J. Clin. Microbiol.* 36, 2035-2037
- Pusterla N., Chae J. S., Kimsey R. B., Berger Pusterla J., DeRock E., Dumler J. S. und Madigan J. E. (2002): Transmission of *Anaplasma phagocytophila* (Human granulocytic Ehrlichiosis Agent) in horses using experimentally infected ticks (Ixodes scapularis). *J. Vet. Med.* B 49, 484-488
- Schusser G. F. (1994): Parenterale Ernährung des Pferdeintensivpatienten. *Wien. Tierärztl. Mschr.* 81, 324-328
- Stannard A. A., Gribble D. H. und Smith R. S. (1969): Equine ehrlichiosis: a disease with similarities to tick-borne fever and bovine petechial fever. *Vet. Rec.* 84, 149-150
- Von Loewenich F. D., Stumpf G., Baumgarten B. U., Röllinghoff M., Dumler J. S. und Bogdan C. (2003): A case of equine granulocytic ehrlichiosis provides molecular evidence for the presence of pathogenic *Anaplasma phagocytophilum* (HGE agent) in Germany. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 22, 303-305

Prof. Dr. Dipl. ECEIM Gerald Fritz Schusser
Universität Leipzig
Medizinische Tierklinik
An den Tierkliniken 11
04103 Leipzig
schusser@vmf.uni-leipzig.de

**2.5 Publikation 5: Kontinuierlich unkonjugierte Hyperbilirubinämie
beim Pferd – Ähnlichkeit mit dem Gilbert-Meulengracht-
Syndrom**

Publiziert in Tierärztl Prax. 2007; 35(G):75-80.

Kontinuierlich unkonjugierte Hyperbilirubinämie beim Pferd – Ähnlichkeit mit dem Gilbert-Meulengracht-Syndrom*

G. F. Schusser¹, M. May¹, A. Meister¹, W. Ohnmar Kyaw¹, T. Lobeck², A. Uhlig¹

Aus der ¹Medizinischen Tierklinik (Direktor: Prof. Dr. Dipl. ECEIM G. F. Schusser) der Veterinärmedizinischen Fakultät, Universität Leipzig, und der ²Tierarztpraxis Eckenhaide

Schlüsselwörter:

Pferd, kontinuierlich unkonjugierte Hyperbilirubinämie, Gilbert-Meulengracht-Syndrom

Zusammenfassung:

Gegenstand und Ziel: Bei einem vierjährigen Vollbluthengst und einem 14-jährigen Fjordpferd-Wallach mit Leistungsdepression über sieben Monate bzw. mehrere Jahre und Ikterus wird eine primär kontinuierlich unkonjugierte Hyperbilirubinämie nachgewiesen. **Material und Methoden:** Im Blut wurden die unkonjugierte und konjugierte Bilirubinkonzentration sowie die Enzymaktivitäten bestimmt. Es erfolgte eine Überprüfung auf hämolytische Anämien (infektiöse Anämie, immunbedingte Erythrozytolyse, Babesiose, Ehrlichiose und primär intravaskuläre Hämolyse) und chronisch entzündliche Lebererkrankungen (Ultraschall und Biopsie). Der Wallach wurde mit 1 mg Phenobarbital/kg KM zweimal täglich p. o. über 20 Tage behandelt, um die Glucuronosyltransferase zu stimulieren und damit das unkonjugierte Bilirubin zu reduzieren. **Ergebnisse:** Die Konzentration des unkonjugierten Bilirubins beider Pferde lag bei Aufnahme zwischen 114,2 (konjugiert 8,3) und 76,4 (konjugiert 8,8) µmol/l und blieb ohne Therapie im Beobachtungszeitraum von vier bzw. fünf Monaten konstant zwischen 111,2 (konjugiert 10,8) und 58,1 (konjugiert 9,3) µmol/l. Der Coggins-Test (infektiöse Anämie) beider Pferde war negativ und der indirekte und direkte Coombs-Test konnten keine autoagglutinierenden Antikörper (immunbedingte Erythrozytolyse) nachweisen. Weder Zoonen (*Babesia equi*) in Erythrozyten noch Morula (*Anaplasma phagocytophila*) in neutrophilen Granulozyten waren nachweisbar. Die Konzentration des freien Hämoglobins im Serum lag beim Fjordpferd im Referenzbereich (zu Beginn 1,07 µmol/l; fünf Monate später 1,36 µmol/l). Beim Wallach ließ sich die Konzentration des unkonjugierten Bilirubins mit Phenobarbital von 76,4 auf 61,6 µmol/l senken. Der Hengst wies zu Beginn leicht erhöhte Aktivitäten der AST und γ-GT auf. Die monatliche Kontrolle der Enzyme AST, γ-GT, AP, GLDH und LDH beider Pferde ergab jedoch keine Abweichungen von den Referenzbereichen. Das Leberultraschallogramm des Hengstes zeigte eine normale Echogenität des Parenchyms und keine erweiterten Gefäße. Chronisch entzündliche Lebererkrankungen beim Hengst konnten mittels histologischer Untersuchung von Leberbiopsaten ausgeschlossen werden. **Schlussfolgerung und klinische Relevanz:** Die Absenkung der Konzentration an unkonjugiertem Bilirubin durch Phenobarbital bei einem Pferd sowie der kontinuierlich erhöhte Serumspiegel des unkonjugierten Bilirubins ohne Nachweis einer hämolytischen Anämie oder chronisch entzündlicher Lebererkrankungen bei beiden Pferden zeigt eine Ähnlichkeit zum hereditären Gilbert-Meulengracht-Syndrom des Menschen. Die Aufnahme des unkonjugierten Bilirubins in die Leberzelle ist bei diesem Syndrom durch eine geringe Aktivität der Glucuronosyltransferase vermindert. Wie in diesen Fällen mit mildem Ikterus ist die primäre von der sekundären unkonjugierten Hyperbilirubinämie (hämolytische Anämien, Lebererkrankungen) zu unterscheiden.

Key words:

Horse, consecutive unconjugated hyperbilirubinemia, Gilbert-Meulengracht's syndrome

Summary:

Objectives: A four-year-old Thoroughbred stallion and a 14-year-old Fjord horse gelding with exercise intolerance over a period of seven months and several years, respectively, had continuing mild icterus. **Material and methods:** Serum bilirubin, standard enzymes and causes of haemolytic anaemia (equine infectious anaemia, immune-mediated haemolytic anaemia, piroplasmosis, equine ehrlichiosis, primarily intravascular hemolysis) were tested. Ultrasonography and biopsy of the stallion's liver were done. The gelding was treated with 1 mg Phenobarbital/kg BW orally two times a day over a period of 20 days for stimulating the glucuronosyltransferase to reduce the unconjugated bilirubin. **Results:** The unconjugated bilirubin of these horses was 114.2 (conjugated 8.3) and 76.4 (conjugated 8.8) µmol/l at admission, respectively. Four and five months later the concentrations of unconjugated bilirubin were 111.2 (conjugated 10.8) and 58.1 (conjugated 9.3) µmol/l. The Coggins test of both horses was negative. The indirect and direct Coombs' tests could not detect autoagglutination antibodies. Immunmediated hemolytic anaemia was excluded. Neither parasitized red blood cells (*Babesia equi*) nor morula in circulating granulocytes (*Anaplasma*

Summary continued next page

Summary continued

phagocytophila) could be detected. The concentration of free hemoglobin in the serum of the gelding was in normal limits at the beginning (1.07 $\mu\text{mol/l}$) and five months later (1.39 $\mu\text{mol/l}$). The orally applied phenobarbital reduced the concentration of unconjugated bilirubin of the gelding from 76.4 to 61.6 $\mu\text{mol/l}$. The enzymes AST and γ -GT of the stallion were slightly increased at admission. However, the monthly controls of enzymes AST, γ -GT, AP, GLDH and LDH in both horses revealed values within the normal ranges. The ultrasonogram of the stallion's liver displayed normal echogenic parenchyma and vascular pattern was not extended. A chronic nonsuppurative inflammatory hepatitis could be ruled out by examination of a liver biopsy in the stallion. **Conclusion and clinical relevance:** The continuing high concentrations of the unconjugated bilirubin in both horses with icterus, the excluded causes of hemolytic anaemia and common liver diseases and the efficacy of phenobarbital to reduce the concentration of unconjugated bilirubin in the serum of the gelding are similarities to Gilbert-Meulengracht's syndrome in humans which is an inherited disease.

Consecutive unconjugated hyperbilirubinemia in horses – similarity to Gilbert-Meulengracht's syndrome

Tierärztl Prax 2007; 35 (G): 75-80

Einleitung

Die Ursachen für eine Hyperbilirubinämie, klinisch als Ikterus sichtbar, sind eine gesteigerte Bilirubinbiosynthese, verminderte Bilirubinbindung an Albumin im Plasma, verminderte hepatische Aufnahme des unkonjugierten Bilirubins aus dem Blut, verminderte hepatische Bilirubinkonjugation oder eine gestörte hepatische Sekretion des konjugierten Bilirubins in die Galle. Die unkonjugierte Hyperbilirubinämie wird hervorgerufen durch gesteigerte Bilirubinbiosynthese, verminderte Bilirubinbindung an Albumin oder verminderte Bilirubinkonjugation (6). Zu einer gesteigerten Bilirubinbiosynthese kommt es bei einer hämolytischen Anämie, wobei diese intravaskulär (durch oxidative Substanzen aus Phenothiazin, Zwiebel, rotem Ahorn oder infolge disseminierter intravaskulärer Koagulopathie) oder extravaskulär (neonatale Isoerythrozytolyse, infektiöse Anämie, Babesiose, immunbedingte Erythrozytolyse, Ehrlichiose) sein kann (3). Auch großflächige Hämatome und Abbau unreifer Zellen der Erythropoese (Shunt-Hyperbilirubinämie) führen zu einem Anstieg der Konzentration an unkonjugiertem Bilirubin. Die verminderte Bilirubinbindung wird durch Hypalbuminämie oder durch Verdrängung der Bindungsstellen für Bilirubin an Albumin infolge vermehrter freier Fettsäuren, Sulfonamiden, Furosemid oder Ampicillin verursacht (6).

Die unkonjugierte Hyperbilirubinämie beim Menschen, ausgelöst durch Störung der Bilirubinaufnahme in die Leberzelle (Gilbert-Meulengracht-Syndrom) oder eine fehlende oder hochgradig verminderte hepatische Bilirubinkonjugation (Crigler-Najjar-Syndrom Typ I und II), verläuft im ersten Beispiel mit mildem und im zweiten mit hochgradigem Ikterus, wobei beim Typ I die Erkrankung im ersten Monat nach der Geburt meist tödlich verläuft und beim Typ II im ersten Lebensjahr manifest wird. Beide Syndrome sind hereditär und werden mit molekularbiologisch genetischen Tests diagnostiziert (4). Das Enzym Bilirubin-Uridin-5'-diphosphat-(UDP)-Glucuronosyltransferase wird auf dem Genlokus UGT1A1 kodiert. Beim Gilbert-Meulengracht-

Syndrom werden zwei Basen in die Promotorregion eingefügt, beim Crigler-Najjar-Syndrom führt die Mutation des Gens zum Austausch von Aminosäuren, zum Wechsel des Leserasters oder zum Stopp der Kodons (4, 6). Das Gilbert-Syndrom wurde bei Southdown-Schafen festgestellt (2). Ein ähnliches Syndrom bei erwachsenen Pferden mit kontinuierlichem Ikterus und bestehender Leistungsdepression wird beschrieben.

Material und Methoden

Zwei erwachsene Pferde (vierjähriger Vollbluthengst, Galopper; 14-jähriger Fjordpferd-Wallach, Reitpferd) wurden wegen siebenmonatiger bzw. mehrjähriger Leistungsdepression sowie kontinuierlichem Ikterus vorgestellt. Fünf Monate bzw. ein Monat vor Aufnahme lagen die Gesamtbilirubinkonzentrationen bei 140,8 $\mu\text{mol/l}$ bzw. 76,3 $\mu\text{mol/l}$.

Beide Pferde wurden einer allgemeinen Untersuchung (10) unterzogen. Blutprobenentnahmen aus der V. jugularis externa (EDTA-Blut und Serum) fanden monatlich statt. Die Leber des Vollbluthengstes wurde mit einem 3,5-MHz-Linearscanner untersucht und es erfolgte eine ultraschallgestützte Leberbiopsie auf der rechten Seite im 13. Interkostalraum über der Thoraxmitte (Abb. 1). Für die hämatologischen Untersuchungen standen die Geräte Technicon H*1 bzw. ADVIA® 120 (F. Bayer Diagnostics, 35463 Fernwald) zur Verfügung. Im Serum des Fjordpferdes wurde das freie Hämoglobin mit der Methode nach Kahn gemessen (1), um eine intravaskuläre Hämolyse nachzuweisen. Die Analyse der Enzymaktivitäten sowie der Konzentrationen von Stoffwechselprodukten und Elektrolyten erfolgte mit den Geräten Hitachi 704 und Hitachi 912 (Fa. Roche Diagnostics GmbH, 68305 Mannheim). Serologische Untersuchungen auf Antikörper gegen das Virus der infektiösen Anämie sowie Leptospiren (*L. pomona*, *L. grippotyphosa*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. sejroe*) wurden in der Landesuntersuchungsanstalt für das Gesundheits- und Veterinärwesen in Leipzig durchgeführt. Die Überprüfung auf indirekte Alloantikörper und freie Autoantikörper sowie der In-vivo-Beladung von Erythrozyten mit Immunglobulinen und Komplementkomponenten erfolgte mittels indirekten und direkten Coombs-Tests im Vet Med Labor Ludwigsburg.

Das Fjordpferd erhielt aufgrund der lange bestehenden, ungeklärten Hyperbilirubinämie Phenobarbital in der Dosis von 1 mg/kg KM zweimal täglich p. o., um die Konjugation des unkonjugierten Bilirubins in der Leber zu fördern.

Ergebnisse

Beide Pferde präsentierten sich bei der Aufnahme ruhig und aufmerksam. Der Vollbluthengst wies mittelgradig ikterische, das Fjordpferd geringgradig ikterische Konjunktiven und Mundschleimhaut auf. Alle übrigen Befunde der allgemein klinischen Untersuchung einschließlich der inneren Körpertemperatur, Puls- und Atmungsfrequenz waren physiologisch, d. h. Lahmheiten, Lungen- und Herzkrankheiten konnten ausgeschlossen werden. Die Ultraschalluntersuchung der Leber des Vollbluthengstes ergab eine normale Struktur der Gefäße und eine normale Echogenität des Leberparenchyms (Abb. 1). Die Leber erstreckte sich auf der rechten Seite nicht über den 14. Interkostalraum hinaus, links ließ sie sich ultrasonographisch nicht darstellen. Mit Ausnahme der Phenobarbitalgabe beim Fjordpferd wurde bei beiden Tieren während der Untersuchungen keine Therapie durchgeführt.

Tabelle 1 listet die hämatologischen Befunde zum Zeitpunkt der Aufnahme und nach vier bzw. fünf Monaten. Die Konzentration des unkonjugierten Bilirubins war in allen Blutproben der Pferde wesentlich erhöht, wobei in der letzten Probe auch die Konzentrationen des konjugierten Bilirubins über dem Referenzbereich lagen. Bei den monatlichen Kontrollen schwankten die Werte des unkonjugierten Bilirubins beim Vollbluthengst zwischen 122 und 196 $\mu\text{mol/l}$, beim Fjordpferd zwischen 58,1 und 76,4 $\mu\text{mol/l}$. Nur die Aktivität der Enzyme Aspartataminotransferase (AST) und Gammaglutamyltransferase (γ -GT) waren beim Vollbluthengst bei der Erstuntersuchung erhöht. Die Aktivitäten der alkalischen Phosphatase (AP), Glutamatdehydrogenase (GLDH) und Laktatdehydrogenase (LDH) befanden sich bei beiden Pferden zu jeder Zeit der Kontrolle im Referenzbereich

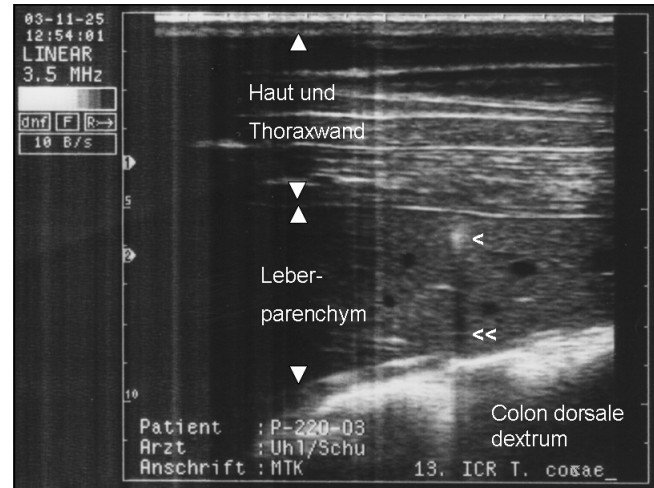


Abb. 1 Ultraschallgestützte Leberbiopsie rechts, 13. Interkostalraum, ventral des Tuber coxae: Ultrasonogramm des Vollbluthengstes mit nicht echogenen Blutgefäßen im uniform echogenen Leberparenchym. Biopsienadel (<) mit Schallschatten (<<).

(Tab. 2). Harnpflichtige Substanzen und Elektrolyte (Gesamtkalzium, anorganisches Phosphat, Natrium, Kalium, Chlorid) im Serum sowie Werte des Säure-Basen-Haushaltes im venösen Blut (Vollbluthengst) waren bei jeder Untersuchung im physiologischen Bereich (Tab. 2). Gleiches galt für die Gallensäurekonzentration des Hengstes (Tab. 2). Die Globulinkonzentration des Vollbluthengstes unterschritt bei der letzten Kontrolluntersuchung den Referenzbereich. Die osmotische Maximalresistenz der Erythrozyten des Vollbluthengstes lag bei 0,48%iger Natriumchlorid-

Tab. 1 Hämatologische Befunde des vierjährigen Vollbluthengstes und des 14-jährigen Fjordpferd-Wallachs bei Aufnahme und nach vier- bzw. fünfmonatiger Kontrolle (stabk. Neutr. = stabkernige neutrophile Granulozyten, segm. Neutr. = segmentkernige neutrophile Granulozyten).

	Referenzwerte (10)	Vollbluthengst		Fjordpferd	
		Aufnahme	Kontrolle nach 4 Monaten	Aufnahme	Kontrolle nach 5 Monaten
Erythrozyten (T/l)	6,8–12,9	9,9	10,4	6,8	6,44
Hämatokrit (l/l)	0,32–0,48	0,41	0,43	0,29	0,27
Hämoglobin (mmol/l)	6,8–11,8	9,1	10,1	7,5	7,0
MCV (fl)	37–58	41,4	41,8	42,6	41,9
MCH (fmol)	0,8–1,2	0,92	0,97	1,10	1,09
MCHC (mmol/l)	19–24	22,20	23,33	25,86	25,92
Thrombozyten (G/l)	100–600	119	130	132	114
Leukozyten (G/l)	5,4–10	7,0	7,0	7,1	7,6
stabk. Neutr. (G/l)	0–0,1	0	0	0	0
segm. Neutr. (G/l)	2,3–8,6	3,36	3,36	4,19	4,79
Lymphozyten (G/l)	1,5–7,7	3,15	3,22	2,49	1,90
Monozyten (G/l)	0–1	0,35	0,42	0,28	0,23
Eosinophile (G/l)	0–1	0,07	0,07	0,14	0,68
Basophile (G/l)	0–0,29	0,07	0,07	0	0

Tab. 2 Blutchemische Untersuchungsbefunde des vierjährigen Vollbluthengstes und des 14-jährigen Fjordpferd-Wallachs bei Aufnahme und nach vier- bzw. fünfmonatiger Kontrolle

	Referenzwerte (10)	Vollbluthengst		Fjordpferd	
		Aufnahme	Kontrolle nach 4 Monaten	Aufnahme	Kontrolle nach 5 Monaten
Gesamtbilirubin ($\mu\text{mol/l}$)	0–45	122,5	122,0	85,2	67,4
unkonjugiertes Bilirubin ($\mu\text{mol/l}$)	4–36	114,2	111,2	76,4	58,1
konjugiertes Bilirubin ($\mu\text{mol/l}$)	0–9	8,3	10,8	8,8	9,3
AST (U/l)	153–411	479	230	234	284
AP (U/l)	240–475	306	297	125	178
GLDH (U/l)	bis 8	3,0	3,0	3,3	4,5
γ -GT (U/l)	11–44	48,4	20,8	9,0	12,8
LDH (U/l)	162–412	392	371	–	319
CK (U/l)	92–307	299	193	–	–
Totalprotein (g/l)	52–77	55	50	56	68
Albumin (g/l)	26–37	32	33	31	31
Harnstoff (mmol/l)	3,3–6,7	5,87	5,57	3,49	5,09
Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)	106–159	130	132	127	121
Gallensäuren (nüchtern) ($\mu\text{mol/l}$)	bis 12	7,8	8,1	–	–
freies Hämoglobin (Serum) ($\mu\text{mol/l}$)	1,18–2,78	–	–	1,07	1,39

lösung (Referenzwert: 0,34%ige Natriumchloridlösung [8]). Die Konzentration an freiem Hämoglobin im Serum des Fjordpferdes betrug bei der Erstuntersuchung 1,07 und bei der letzten Kontrolluntersuchung 1,39 $\mu\text{mol/l}$ und überstieg damit den Referenzbereich des Labors der Medizinischen Tierklinik nicht.

Der indirekte Coombs-Test war bei beiden Pferden und der direkte Coombs-Test beim Vollbluthengst negativ. Der direkte Coombs-Test wurde beim Fjordpferd nicht durchgeführt. Der Coggins-Test detektierte bei keinem Pferd Antikörper gegen das Virus der infektiösen Anämie. Antikörpertiter gegen die angegebenen Leptospirenspezies konnten mittels Mikroagglutinationsreaktion nicht nachgewiesen werden.

Die histologische Untersuchung des Leberbiopsats¹ des Vollbluthengstes ergab eine Anisozytose der Hepatozyten mit diffuser intrazellulärer Pigmentspeicherung (Galle), geringgradige interstitielle, mononukleäre Infiltrate in den Portalfeldern, geringgradige Gallengangsproliferation und geringgradige portale Fibrose.

Nach 20-tägiger Phenobarbitalgabe sank die Konzentration des unkonjugierten Bilirubins beim Fjordpferd von 76,4 auf 61,6 $\mu\text{mol/l}$.

Diskussion

Die gelbe Farbe der Sklera, Konjunktiva und/oder der Mundschleimhaut, die bei einer Konzentration von 75 $\mu\text{mol/l}$ Gesamt-

bilirubin im Blut sichtbar wird, ist das klinische Symptom des Ikterus. Eine erhöhte Gesamtbilirubinkonzentration wird verursacht durch gesteigerte Bilirubinbiosynthese, verminderte Bilirubinbindung an Albumin (Störung des Transports), verminderte oder fehlende Bilirubinkonjugation, Störung der Exkretion des konjugierten Bilirubins in die Gallenkanalikuli oder die Regurgitation des konjugierten Bilirubins bei extrahepatischem Verschluss (7). Entsprechend kann der Sitz der Störung, beschrieben für den Menschen, prämikrosomal (Bilirubinbildung, Bilirubintransport durch Albumin, Aufnahme des unkonjugierten Bilirubins in die Leberzelle, Bindung des unkonjugierten Bilirubins an die Makromoleküle Ligandin und Z-Protein), mikrosomal (Veresterung des unkonjugierten Bilirubins mit Uridindiphosphat-(UDP)-Glucuronsäure durch das Enzym Bilirubin-Uridin-5'-diphosphat-(UDP)-Glucuronosyltransferase im endoplasmatischen Retikulum der Leberzelle) oder postmikrosomal (als UDP-Bilirubindiglucuronid in die Gallenkanalikuli sezerniert) lokalisiert sein (6, 7). Die prähepatische Phase beim Menschen umfasst die Bilirubinbildung aus Hämoglobinabbau (85%), ineffektiver Erythropoese (10–15%) und Hämifermenten (1–5%) sowie den Transport des unkonjugierten Bilirubins, die hepatische Phase die Aufnahme des unkonjugierten Bilirubins in die Leberzelle, die vorhin beschriebene Konjugation und die Sekretion in die Gallenkanalikuli, während die posthepatische Phase die Exkretion des konjugierten Bilirubins als Bilirubindiglucuronid in den Dünndarm erfasst (7).

Da das Fjordpferd zu keiner Zeit erhöhte Aktivitäten der Transaminase AST, der AP, GLDH, γ -GT und LDH im Serum aufwies und der Vollbluthengst nur bei der Erstuntersuchung eine erhöhte Aktivität der AST und γ -GT zeigte und alle übrigen Enzym-

¹ Durchgeführt im Institut für Veterinär-Pathologie (Direktor Prof. Dr. H. A. Schoon), Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig.

werte im physiologischen Bereich lagen, kann eine chronisch entzündliche Lebererkrankung als Ursache der unkonjugierten Hyperbilirubinämie ausgeschlossen werden. Auch die normale Serumkonzentration der Gallensäuren des Vollbluthengstes und des konjugierten Bilirubins beider Pferde unterstreichen die normale Exkretionsleistung der Leber und erklären somit nicht die erhöhte Konzentration des Gesamtbilirubins. Auch die Syntheseleistung der Leber, bezogen auf Albumin und Harnstoff, war bei beiden Pferden normal. Die sonographische Untersuchung beim Vollbluthengst zeigte eine normale Echogenität des Leberparenchyms, eine normale Struktur und Größe der Gefäße und keine Vergrößerung oder Verkleinerung der Leber, sodass kein Hinweis auf eine chronisch entzündliche Lebererkrankung bestand. Die Gesamtleukozytenzahl und das Neutrophilen-Lymphozyten-Verhältnis, als Ausdruck einer Entzündung, wichen bei keiner Messung vom Referenzbereich ab. Die histologischen Befunde des Leberbiopats des Hengstes beinhalteten keine Infiltration von polymorphkernigen oder mononukleären Zellen in das Parenchym, sondern die geringgradigen, mononukleären Infiltrate beschränkten sich auf die Portalfelder. Eine Verbreiterung der Portalfelder mit Fibrose, die bei chronisch persistierenden Leberentzündungen beschrieben ist (9), war ebenfalls nicht nachweisbar.

Die unkonjugierte Hyperbilirubinämie hat ihre Ursachen im vermehrten Anfall des Hämoglobins im Zuge des Erythrozytenabbaus. Dieser entsteht als Folge von hämolytischen Anämien, wie infektiöse Anämie oder immunbedingte Erythrozytolyse, die sich bei beiden Pferden mittels Coggins- und Coombs-Tests nicht nachweisen ließen. Auch bei mehrfachen Untersuchungen konnten weder im roten Blutbild Babesien in Erythrozyten noch im weißen Blutbild Morulastadien der equinen granulozytären Ehrlichiose in neutrophilen Granulozyten gefunden werden (3). Eine Babesiose auch ohne nachweisbare Zoiten in den Erythrozyten verursacht einen hochgradigen Ikterus. Eine dreitägige Therapie der Pferde mit nachgewiesenen Morulastadien in neutrophilen Granulozyten oder mit Antikörpertitern gegen equine granulozytäre Ehrlichiose führt zu einem Absinken der Gesamtbilirubinkonzentration bis in den Referenzbereich. Eine subklinische Ehrlichiose erzeugt keine Hyperbilirubinämie (3). Eine höhergradige primär intravaskuläre Hämolyse, die auch als Ursache der hämolytischen Anämie gilt, war beim Fjordpferd ebenfalls nicht nachweisbar, da die Konzentration des freien Hämoglobins den Referenzbereich nicht überschritt (3). Eine sehr seltene Ursache der unkonjugierten Hyperbilirubinämie ist die ineffektive Erythropoese, auch Shunt-Hyperbilirubinämie genannt (6). Diese kann ausgeschlossen werden, da bei keinem Pferd eine ausgeprägte Anämie vorlag. Zwar lagen Hämatokrit und Erythrozytenzahl des Fjordpferdes bei der Kontrolluntersuchung nach fünf Monaten unterhalb des Referenzbereichs, doch muss hier die Untersuchungsmethode mit dem Hämatologiesystem ADVIA von Bayer Diagnostics diskutiert werden, weil die aktuellen hämatologischen Ergebnisse bei den zurzeit kontrollierten Pferden im Allgemeinen niedriger ausfallen. Werden die Referenzbereiche für Hämatokrit und Erythrozytenzahl des Kaltblutpferdes und Ponys von 0,32–0,44 l/l und 0,30–0,40 l/l bzw. von 6,0–9,0 T/l und

5,5–8,5 T/l, zitiert nach Kraft und Dürr (5), herangezogen, so lag nur der Hämatokrit des Fjordpferdes unterhalb des Referenzbereichs. Die Hämoglobinkonzentration befand sich jedoch im Referenzbereich und Hämoglobin ist der Hauptlieferant für das unkonjugierte Bilirubin (7).

Da hämolytische Anämien und chronisch entzündliche Leberkrankheiten ausgeschlossen werden konnten, wiesen das Alter der beiden Pferde, die Leistungsdepression und die milde Form des Ikterus mit unkonjugierter Hyperbilirubinämie auf eine Ähnlichkeit mit dem beim Menschen beschriebenen Gilbert-Meulengracht-Syndrom hin. Bei diesem Syndrom liegt eine kombinierte Störung der Bilirubinaufnahme in die Leberzelle und eine geringgradige Verminderung der Glucuronosyltransferaseaktivität vor (7). Die erwachsenen Menschen im Alter zwischen 20 und 30 Jahren zeigen Müdigkeit und verminderte Leistungsfähigkeit sowie geringgradigen Ikterus, unkonjugierte Hyperbilirubinämie, normale Aktivität der Transaminasen, AP und der γ -GT und keine histologisch entzündlichen Veränderungen des Lebergewebes (4, 7). Durch die Gabe von Phenobarbital lässt sich die Glucuronosyltransferase deutlich induzieren und die erhöhte Konzentration des unkonjugierten Bilirubins deutlich absenken (7), was auch beim Fjordpferd eintrat. Somit könnte bei beiden Pferden ein Mangel an Glucuronosyltransferase vorgelegen haben, der die kontinuierlich unkonjugierte Hyperbilirubinämie erklären kann. Das Crigler-Najjar-Syndrom Typ I beim Menschen weist einen vollständigen Mangel der Glucuronosyltransferase auf und führt zu hochgradigem Kernikterus und ein bis drei Tage nach der Geburt zum Tod. Beim Crigler-Najjar-Syndrom Typ II, das sich im ersten Lebensjahr manifestiert, besteht ein mittelgradiger Ikterus infolge hochgradiger Verminderung der Glucuronosyltransferaseaktivität. Bei beiden Typen sind die sehr jungen Patienten schwer krank und zeigen eine mittel- bis hochgradige Konzentrationserhöhung des unkonjugierten Bilirubins (4, 6, 7). Das Crigler-Najjar-Syndrom scheidet bei den genannten Pferden aufgrund des Alters und der milden Form des Ikterus aus.

Weitere retro- und prospektive Untersuchungen inklusive molekularbiologisch genetischer Kontrollen sind notwendig, um das Vorkommen des Gilbert-Meulengracht-Syndroms als hereditäre Krankheit in der Pferdepopulation zu erfassen und zu bestätigen.

Fazit für die Praxis

Nicht nur hämolytische Anämien und chronisch entzündliche Leberkrankheiten führen beim Pferd zum Ikterus. Auch die gestörte Bilirubinaufnahme und leichte Verminderung der Glucuronosyltransferaseaktivität in der Leberzelle verursachen beim Pferd Ikterus infolge kontinuierlich erhöhter unkonjugierter Hyperbilirubinämie.

Literatur

1. Bednar R, Bayer PM. Freies Hämoglobin im Plasma – Vergleich zweier spektralphotometrischer Methoden Bilirubin als Störfaktor. *Lab. med.* 1994; 18: 196–9.
2. Cornelius CE, Gronwall RR. Congenital photosensitivity and hyperbilirubinemia in Southdown sheep in the United States. *Am J Vet Res* 1968; 29: 291–4.
3. Davis E, Wilkerson MJ. Hemolytic anaemia. In: *Current Therapy in Equine Medicine*, 5th ed. Robinson NE, ed. New York: Saunders 2003; 344–8.
4. Kraemer D, Scheurlen M. Gilbert disease and type I and II Crigler-Najjar syndrome due to mutations in same UGT1A1 gene locus. *Med Klin (Munich)* 2002; 97 (9): 528–32.
5. Kraft W, Dürr UM, Hrsg. *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*. Stuttgart, New York: Schattauer 2005.
6. Lammert L, Matern S. Leber. In: *Klinische Pathophysiologie*. Siegenthaler W, Hrsg. Stuttgart, New York: Thieme 2001; 845–76.
7. Meyer zum Büschenfelde KH, Hütteroth TH. Lebererkrankungen. In: *Lehrbuch der inneren Medizin*. Siegenthaler W, Kaufmann W, Hornbostel H, Waller HD, Hrsg. Stuttgart, New York: Thieme 1992; 1133–85.
8. Morris DD. Alterations in the erythron. In: *Large Animal Internal Medicine*. Smith BP, ed. St. Luis, Wiesbaden: Mosby 1996; 473–9.
9. Peek SF. Liver disease. In: *Current Therapy in Equine Medicine*, 5th ed. Robinson NE, ed. New York: Saunders 2003; 344–8.
10. Schusser, GF. Themenbereich Pferd. In: *Klinische Propädeutik der inneren Krankheiten und Hautkrankheiten der Haus- und Heimtiere*, 6. Aufl. Baumgartner W, Hrsg. Berlin, Wien: Parey 2005.

Prof. Dr. Dipl. ECEIM Gerald Fritz Schusser
 Medizinische Tierklinik
 Veterinärmedizinische Fakultät
 der Universität Leipzig
 An den Tierkliniken 11
 04103 Leipzig
 E-Mail: schusser@vmf.uni-leipzig.de

3 Diskussion

3.1 Entwicklung der Methode zur Bestimmung des fr. Hb und Ermittlung des Referenzbereiches

Sowohl die Methode von HARBOE als auch die Methode von KAHN wird heute noch in der Humanmedizin für die Bestimmung des fr. Hb im Blutplasma verwendet. Die Bestimmung des freien Hämoglobins mit Hilfe des Absorptionsspektrums wurde erstmals von FLINK und WATSON 1942 beschrieben. Jedoch war diese Methode nicht spezifisch genug (FLINK u. WATSON 1942). Im Jahre 1959, entwickelte HARBOE eine spektrophotometrische Methode, unter Ausnutzung der Soret-Bande des Hämoglobins (HARBOE 1959). Eine weitere Methode zur Bestimmung des Hämoglobins wurde von BLAKNEY und DINWOODIE 1975 entwickelt. Dieser Methode liegt die Messung der Absorption bei 577 nm mit einer Untergrundkorrektur bei 562-598 nm zugrunde. Es zeigte sich, dass diese Methode geeignet ist, die Konzentration des fr. Hb im Plasma auch in Gegenwart von Bilirubin, Metalbumin oder Trübheit zu bestimmen.

Für den Einsatz in der Veterinärmedizin wurden beide Methoden getestet und verschiedene Einflussfaktoren untersucht. Die Methode nach HARBOE mit einer Messwellenlänge von 415 nm erfüllt die Anforderungen beim Pferd bezüglich Richtigkeit und Reproduzierbarkeit der Messungen nicht. Die Störungen durch Bilirubin und andere Häm pigmente werden nicht eliminiert (HARBOE 1959). In der Methode nach KAHN wird die Absorptionsbande des Oxyhämoglobins, die proportional zur Konzentration des Hämoglobins ist, bei 578 nm gemessen. Aufgrund der im Wellenlängenbereich von 562-598 nm erfolgten Untergrundkorrektur, beeinflussen Bilirubin und andere Häm pigmente das Messergebnis nicht (KAHN et al. 1981; BEDNAR u. BAYER 1994). Die Methode nach KAHN ist deshalb spezifischer als die Methode nach Harboe und liefert reproduzierbarere Ergebnisse. Der lineare Bereich der Methode nach KAHN erstreckt sich in unseren Untersuchungen von 0,21 $\mu\text{mol/l}$ bis 105 $\mu\text{mol/l}$. Die Messung höherer Konzentrationen erfordert somit eine Verdünnung der Proben.

Um zu prüfen, ob die Messung des fr. Hb durch Bilirubin gestört wird, wurden Plasmaproben mit unterschiedlichen Konzentrationen an fr. Hb und Bilirubin hergestellt und die Messung des fr. Hb durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Messung des fr. Hb im Plasma durch eine

Bilirubinkonzentration bis zu 152,7 $\mu\text{mol/l}$ nicht signifikant beeinflusst wird. Bei Bilirubinkonzentrationen über dieser Grenzkonzentration sollten die Plasmaproben so verdünnt werden, dass die Bilirubinkonzentration unter 152,7 $\mu\text{mol/l}$ liegt. Für die Anwendung dieser Methode in der Humanmedizin wurde eine Grenzkonzentration von 600 $\mu\text{mol/l}$ ermittelt, die aber im lebenden menschlichen Organismus nie erreicht wird (BEDNAR u. BAYER 1994; KAHN et al. 1981). Im Gegensatz zur Humanmedizin kann bei Pferden die Grenzkonzentration überschritten werden. Somit muss, begleitend zur Bestimmung des fr. Hb, auch die Bilirubinkonzentration gemessen werden.

Neben Bilirubin kann auch Myoglobin die Messung des fr. Hb im Plasma stören. In der Regel wird Myoglobin sehr schnell über die Niere ausgeschieden und erreicht im Plasma nur selten höhere Konzentrationen. Jedoch können Schädigungen der Muskelzellen kurzzeitig zu einer erheblichen Zunahme der Myoglobinkonzentration im Plasma führen (BOULTON u. HUNTSMAN 1971; ZENG et al. 2005). Um den Einfluss des Myoglobins auf die Messung des fr. Hb zu untersuchen, wurde die Myoglobinkonzentration bis zu 176 $\mu\text{mol/l}$, durch Zugabe von Myoglobin, erhöht. Dabei zeigten sich keine Beeinflussungen der Messung niedriger (1,04 $\mu\text{mol/l}$) und hoher Hb-Konzentrationen (90,0 $\mu\text{mol/l}$) durch Myoglobin.

Plasmatrübungen, vor allem durch Triglyzeride, können die Messung des fr. Hb stören. Bei der spektralphotometrischen Methode nach KAHN werden auch diese Störeinflüsse minimiert, sodass selbst bei hohen Triglyzeridkonzentrationen (5,71 mmol/l) valide Ergebnisse erhalten werden. Auch pH-Wert-Änderungen und unterschiedliche Proteinkonzentrationen im Plasma haben keinen Einfluss auf das Messergebnis (BLAKNEY u. DINWOODIE 1975; KAHN et al. 1981).

Die Gewinnung des Plasmas muss durch eine sorgfältige Blutentnahme erfolgen und die anschließende Bearbeitung der Proben ist eine entscheidende Voraussetzung zur exakten quantitativen Messung des fr. Hb, da eine iatrogene *in-vitro* Hämolyse ausgeschlossen werden muss. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Blutentnahmetechniken. Wobei sich die Befüllung des Probengefäßes direkt aus der Kanüle als am besten geeignet erwies. Experimentell konnte nachgewiesen werden, dass die gemessene fr. Hb-Konzentration nach Blutabnahme und sofortiger Zentrifugation der Heparinblutproben signifikant höher ist als nach 30-minütiger Sedimentation der Blutzellen inklusive Zentrifugation des Plasmaüberstandes. Vergleichende Untersuchungen zeigten den Einfluss der

Antikoagulantien auf die fr. Hb-Konzentration. K-EDTA verursacht eine geringfügig stärkere *in-vitro*-Hämolyse. Plasmaproben können ohne Beeinflussung der Messung des fr. Hb bis 48 Stunden im Kühlschrank bei 4° C gelagert werden. Ein Einfrieren der Proben und die Lagerung bei -20° C für maximal drei Monate sind ebenfalls möglich.

Serum eignet sich für die Bestimmung des fr. Hb nicht, da bei der Koagulation und der anschließenden Zentrifugation eine Hämolyse auftreten kann und somit die Konzentration des fr. Hb artifiziell erhöht wird (BEDNAR u. BAYER 1994).

Wie SOLBERG in seiner Theorie der Referenzwerte ausführt, sind für die Bestimmung des nichtparametrischen Referenzbereiches mindestens 120 Fälle notwendig, wenn man das 95%-Perzentil-Intervall zugrunde legt. (SOLBERG 1987; KRAFT et al. 2005). Für die Bestimmung des Referenzbereiches für fr. Hb wurden erstmals 188 gesunde Pferde beprobt. Unter diesen Tieren befanden sich auch 21 Fohlen und 16 Jungpferde. Die gemessenen Konzentrationen an fr. Hb bei den Fohlen wurden aber nicht zur Bestimmung des Referenzbereiches herangezogen, da bei Fohlen in den ersten drei Lebensmonaten, durch den Abbau der fötalen Erythrozyten, die Konzentration des fr. Hb erhöht wird (OSKI 1969). Aufgrund der geringen Anzahl kann kein Referenzbereich für diese Gruppe angegeben werden, aber es wurde ein Richtwertbereich zwischen 0,11-2,05 µmol/l ermittelt. Auch die 16 Jungpferde wurden nicht bei der Referenzbereichsberechnung berücksichtigt, da der Erythrozytenmetabolismus in dieser Altersklasse noch sehr unregelmäßig sein kann. Der Richtwertbereich, der aus diesen 16 Pferden ermittelt wurde, liegt zwischen 0,19 -2,57 µmol/l.

Somit wurde der Referenzbereich für das fr. Hb aus den anderen 151 erwachsenen Pferden errechnet. Für das fr. Hb im Plasma lag dieser Referenzbereich zwischen 0,09–2,01 µmol/l. Der von BEDNAR und BAYER, ermittelte Referenzbereich für das fr. Hb beim Menschen liegt zwischen 0,37-3,17 µmol/l (BEDNAR u. BAYER 1994). Der deutlich niedrigere Referenzbereich beim Pferd, kann mit den unterschiedlichen Probenvorbereitungstechniken erklärt werden. Nach der Methode von BEDNAR und BAYER wird das Blut nach der Entnahme sofort 10 min zentrifugiert. In der vorliegenden Arbeit wurde, wie oben beschrieben, das Blut sedimentiert und der Überstand nur 5 min zentrifugiert.

3.2 *Fr. Hb und TNF- α bei Pferden mit Kolik und akuter Kolitis*

In der Medizinischen Tierklinik der VMF der Universität Leipzig werden jährlich 350 Pferde behandelt. Die Hälfte aller Pferdepatienten kommt mit akuten Magen-Darm-Krankheiten in die Klinik.

Um die Bedeutung des fr. Hb bei Magen-Darm-Krankheiten nachzuweisen, wurde eine Untersuchung mit vier Tiergruppen durchgeführt. Die Gruppe 1, die Kontrollgruppe, bestand aus 14 gesunden Pferden. In der Gruppe 2 wurden 13 Patienten mit einer nichtstrangulierenden Obstruktion zusammengefasst. Der Gruppe 3 wurden 11 Pferde mit Strangulation des Dün- oder Dickdarmes zugeordnet. In der Gruppe 4 befanden sich 12 Pferde mit akuter Kolitis und hochgradiger Entzündung (Peritonitis oder Thrombophlebitis).

Bei einer Strangulation oder akuten Kolitis kann es zu einer lokalen oder systemischen Entzündung kommen. Verschiedene Entzündungsmediatoren und Zytokine, wie das TNF- α , werden dabei lokal produziert. Obwohl die Zytokine sensitiv für den Schweregrad eines Krankheitsverlaufes sind, wird die Bestimmung der Zytokine nur für Forschungszwecke eingesetzt, da die Bestimmung sehr zeit- und kostenintensiv ist. Dagegen ist die Bestimmung des Laktates ein besserer Indikator. Bei Kolikpferden mit Strangulation oder septischer Peritonitis ist aufgrund der anaeroben Glykolyse die Laktatkonzentration im Blut signifikant erhöht. Das Laktat ist ebenfalls ein Indikator für intestinale Ischämie (NAPPERT u. JOHNSON 2001; GROSCHE et al. 2006). Die Serumlaktatkonzentration der Gruppen 3 und 4 waren signifikant erhöht. Dies weist auf eine Schädigung der intestinalen Barriere hin, und somit wäre diese Hyperlaktatämie ein großer Hinweis auf eine bestehende Endotoxämie.

Ist die intestinale Darmwandbarriere durch eine Entzündung nachhaltig geschädigt worden, können Bakterien und Endotoxine in die Blutbahn gelangen (MOORE u. MOORIS 1992; MACKAY 1992; BARTON u. COLLATOS 1999). Endotoxine wurden erstmals 1963 durch ROONEY et al. mit einer Kolitis in Zusammenhang gebracht, die aufgrund der unklaren Ursache als "Kolitis X" bezeichnet wurde. In einem Reviewartikel von MOORE und MORRIS (MOORE u. MORRIS, 1992) wurde beschrieben, dass Pferde unter physiologischen Umständen große Mengen an gram-negativen Bakterien in ihrem Intestinaltrakt haben. Diese Bakterien können große Mengen Endotoxin freisetzen, wenn sie absterben oder sich stark vermehren. Deshalb befindet sich viel Endotoxin unter physiologischen Bedingungen im

intestinalen Lumen. So berichtet MACKAY von einem Fall, bei dem im Zäkum und in den ventralen Kolonlängslagen eines gesunden Pferdes 2,25 g freies Endotoxin gefunden werden konnte (MACKAY 1992).

Endotoxin, das in den Blutkreislauf gelangt ist, aktiviert zum einen die neutrophilen Granulozyten, die ihrerseits reaktive Sauerstoffspezies und Radikale erzeugen. In einigen Experimenten konnte die oxidatative Schädigung der Erythrozytenmembran durch reaktive Sauerstoffradikale nachgewiesen werden (CLASTER et al. 1984; POWELL et al. 1991). Zum anderen wird durch Endotoxin das Komplementsystem aktiviert (BARDAKHCH' YAN et al. 1992; LIESE et al. 2001). Durch diese beiden Prozesse wird die Erythrozytenmembran geschädigt oder zerstört, so dass es zur intravaskulären Hämolyse kommt. Das dabei freiwerdende Hämoglobin und andere Enzyme gelangen somit in die Blutbahn.

Eines dieser Enzyme ist LDH, das seit langem als ein Marker für intravaskuläre Hämolyse bekannt ist. Nach der intravaskulären Hämolyse steigt die LDH-Aktivität im Plasma, da in den Erythrozyten eine hohe LDH-Konzentration vorliegt (DUNCAN et al. 1994). Der Anstieg der LDH-Aktivität konnte bei den Gruppen 3 und 4 beobachtet werden und er entwickelte sich parallel zur Erhöhung des fr. Hb im Plasma.

Das fr. Hb kann, wie *in-vitro*-Tests von KACA et al. zeigten, als endotoxinbindendes Protein, die biologische Aktivität von Endotoxin weiter erhöhen, und somit die Erythrozytolyse verstärken (KACA et al. 1994; SU et al. 1997; JÜRJENS et al. 2001). Auch bei gesunden Tieren kommt es zur Hämolyse alternder Erythrozyten. Das entstehende fr. Hb bildet mit Haptoglobin den Hb-Hp-Komplex. Dieser Komplex wird durch den CD163-Rezeptor der Monozyten aufgenommen und in der Leber abgebaut. Aufgrund des oxidativen Stresses wird die Leber geschädigt, und es kommt zu einer Erhöhung der Bilirubinkonzentration im Blutserum (SULIMAN et al. 2003). Diese Hyperbilirubinämie kann prämikrosomale, mikrosomale oder postmikrosomale Ursachen haben. Die Konzentration des indirekten Bilirubins wird bei Pferden meistens durch die reduzierte Futteraufnahme und die intravaskuläre Hämolyse erhöht. Wegen der erhöhten Konzentration an fr. Hb bei den Pferden der Gruppen 3 und 4, sind die Ursachen der erhöhten Konzentration des indirekten Bilirubins, bei diesen Pferden, in einer reduzierten Futteraufnahme (Inanitionsikterus), intravaskulärer Hämolyse und Leberschäden zu suchen.

Eine Erhöhung des fr. Hb kann zur Folge haben, dass die Hb-Hp-Clearance nicht mehr ausreichend ist. Des Weiteren konnten SCHAER et al. zeigen, dass bei einer Endotoxämie die CD163-Expression der Monozyten reduziert ist und somit Hb-Hp-Clearance unterbrochen wird. Dies hat zur Folge, dass der daraus resultierende toxische Effekt, aufgrund des verzögerten Metabolismus des toxischen Hb-Hp-Komplexes, zur Pathogenese der systemischen Entzündungsreaktionen beiträgt (SCHAER et al. 2007).

Weiterhin kommt es durch den Anstieg der Konzentration an fr. Hb zur Reduktion von Stickstoffmonoxid (NO) im Blutkreislauf. Dies führt zu einer NO-induzierten Dysfunktion der Endothelzellen, die durch die Aktivierung der Makrophagen und Thrombozyten, Thrombozytenaggregation, Motilitätsstörung des Magen-Darm-Traktes, Gefäßverengung, oxidativen Stress und durch den proinflammatorischen Effekt gekennzeichnet ist (ROTHER et al. 2005). Da mit zunehmender Hämolyse die NO-Konzentration abnimmt, aber die LDH-Aktivität zunimmt, kann die LDH als Marker für die NO-Suppression angesehen werden (KATO et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit lagen die Medianwerte für die LDH-Aktivität bei den Gruppen 3 und 4 bei 935 U/l und 412,5 U/l. Diese Werte zeigen eine deutliche Zunahme des fr. Hb bei diesen Magen-Darm-Krankheiten. Da die Pferde der Gruppe 3 eine Strangulation des Darmes aufwiesen und somit Gewebszerstörungen hatten, ist die LDH-Aktivität höher als in Gruppe 4, in der die Pferde eine Kolitis mit Peritonitis hatten.

Auch die Medianwerte der fr. Hb-Konzentration der Gruppen 3 und 4 waren mit 8 µmol/l und 9,1 µmol/l deutlich erhöht. In der Blutbahn wird fr. Hb zu Methämoglobin oxidiert. Methämoglobin mit seinem dreiwertigen zentralen Eisenatom, ist ein Katalysator für weitere Oxidationen. Dadurch wird der oxidative Stress noch weiter verstärkt. Sowohl das fr. Hb als auch das Methämoglobin stimulieren die Zytokinproduktion der Makrophagen (DAVIES et al. 1987; McFAUL et al. 2000; LIESE et al. 2001).

In der vorliegenden Arbeit ist nicht nur das fr. Hb bei den Patienten der Gruppen 3 und 4 erhöht, sondern auch die Konzentration an TNF-α. Die Medianwerte der Gruppen 3 und 4 lagen bei 14665 pg/ml und 15081 pg/ml. Im Vergleich dazu lag der Medianwert der Kontrollgruppe bei 573 pg/ml. Diese positive Korrelation der beiden Parameter zeigt den synergistischen Effekt von fr. Hb und TNF-α.

Der hier beschriebene Mechanismus der Hyperperfusion von Endotoxinen in den Blutkreislauf, der endotoxininduzierten Aktivierung der neutrophilen Granulozyten, der komplementaktivierten Hämolyse und der Entstehung von oxidativem Stress führt zu einer Reihe von Symptomen die unter dem Begriff systemisch inflammatorisches Responsesyndrom (SIRS) zusammengefasst werden. Zu den Symptomen von SIRS gehören Fieber oder Hypothermie, Tachypnoe und Tachykardie, Thrombozytopenie, Leukopenie, Leukozytose oder Linksverschiebung ($> 10\%$ stabkernige neutrophile Granulozyten) (BONE et al. 1991).

In Experimenten konnte gezeigt werden, dass die klinisch-pathologische Antwort auf eine Endotoxämie eine Symptomatik zeigt, die SIRS nahelegt und mit der erhöhten Freisetzung von Zytokinen zu einem septischen Schock führt (OIKAWA u. YOMAOKA 2003).

Bei der klinischen Untersuchung der Pferde der Gruppe 3 und 4 zeigten die Tiere Fieber oder erniedrigte innere Körpertemperatur, Tachypnoe und Tachykardie, verminderte Hautelastizität, gerötete Schleimhäute und kalte Akren. Die hämatologische Untersuchung des Blutes der Patienten der Gruppen 3 und 4 zeigte Thrombozytopenie, Leukopenie ($< 4,1$ G/l), Leukozytose (> 13 G/l) oder eine Linksverschiebung mit mehr als 10% stabkernige neutrophile Granulozyten. Bei diesen Patienten mit SIRS konnte sowohl ein Anstieg des fr. Hb als auch des TNF- α beobachtet werden.

Um eine Endotoxämie nachzuweisen, müsste die Endotoxinkonzentration im Blut gemessen werden. Dies ist aber nur bedingt möglich, da aus der Literatur bekannt ist, dass das Endotoxin schnell aus dem Blutkreislauf entfernt wird, aber die oben beschriebenen Symptome bleiben. So untersuchten OIKAWA et al. 15 Pferde auf Endotoxin im Blut. Bei drei Pferden konnte Endotoxin im Blut gefunden werden, aber alle 15 Pferde zeigten die Symptome einer Endotoxämie. Deshalb wird eine Endotoxämie sowohl durch das Vorhandensein von Endotoxin im Blut oder auch durch das Auftreten der klinischen Symptome definiert (OIKAWA et al. 2006). Für die Schwere der Endotoxämie und für die Abschätzung der Prognose können fr. Hb und TNF- α ein guter Marker sein.

Die Pferde aus den Gruppen 3 und 4, die die höchsten Konzentrationen an TNF- α und fr. Hb hatten, konnten nicht geheilt werden und wurden euthanasiert. Bei einer Konzentration des fr. Hb über $7\text{ }\mu\text{mol/l}$ sind die Erfolgchancen der Therapie schlecht. Ein therapeutischer Ansatz,

der zurzeit in der Humanmedizin Anwendung findet, ist die Gabe von NO. Durch Erhöhung des NO wird die NO-Reduktion durch das entstehende fr. Hb kompensiert (MINNECI et al. 2005; MACK and KATO 2006; YU et al. 2008). Ein neuer Ansatz in der Therapie von Endotoxämie ist die Blockade des TNF- α -Converting Enzym durch ein anti-TNF- α -Converting Enzyme (MAEDA et al. 2003; HAGA et al. 2008).

3.3 Fr. Hb und equine infektiöse Anämie

EIA entsteht durch eine Infektion mit dem Lentivirus, dass zur Subfamilie der *Retroviridae* gehört, und wird durch rekurrendes Fieber, Thrombozytopenie und Anämie bei chronisch infizierten Patienten charakterisiert (SQUIRE 1968; NAKAJIMA et al. 1973; OAKS et al. 1999). Pferde, die sich mit dem EIA-Virus infiziert haben, entwickeln eine persistente Infektion. Die Anämie bei EIA ist ein multifaktorielles Geschehen, bei dem sowohl die immunmodulierte Zerstörung der Erythrozyten als auch die Knochenmarksuppression eine Rolle spielt (PERRYMAN et al. 1971; SENTSUI u. KONO 1987). Das EIA-Virus erzeugt bei chronisch kranken Pferden somit eine manifeste Anämie. In den virämischen Abschnitten des Krankheitsverlaufes heften sich Immunkomplexe an die Erythrozyten mit der Folge, dass eine komplementvermittelte intra- und extravasculäre Hämolyse eintritt (CHEEVERS u. McGUIRE 1985). SWARDSON u. KOCIBA (1994) berichten, dass in der ersten Zeit nach der Infektion keine Anämie bei infizierten Tieren zu beobachten war. In der Anfangsphase tritt keine Anämie auf, aber nach 2 Wochen erreicht die Virämie ihren Höhepunkt, und es tritt eine Anämie durch die Suppression der CFU-E ein.

Die klinischen Anzeichen für eine EIA können sehr verschieden sein, auch für die Pferde, die sich mit dem gleichen Stamm infiziert haben. Die meisten infizierten Pferde sind inapparente Träger, die das Virus bis zum Lebensende in sich tragen können (HOMMOND et al. 2000). Für diesen Fall ist der Coggins-Test der einzige serologische Test für die Diagnosestellung (COGGINS u. NORCROSS 1970). Es wird geschätzt, dass 30 % - 90 % der Pferde, die mit EIA infiziert sind, klinisch unauffällig sind, und somit keine Anzeichen dieser Infektionskrankheit zeigen (ISSEL et al. 1988). Um eine Ausbreitung der Infektion wirkungsvoll zu verhindern ist es wichtig, die klinischen Zeichen der inapparenten Form der EIA zu erkennen.

Es wurden 4 Warmblüter (3 Hengste und eine Stute; 8-10 Jahre), die aus Rumänien importiert wurden, mit dem Coggins-Test positiv auf EIA getestet. Alle 4 Pferde zeigten sich klinisch

unauffällig und es wurde nur von einer leichten Leistungsdepression berichtet. Bei drei Pferden trat ein leichtes 24-stündiges Fieber auf. Das vierte Pferd hatte 6 Tage lang eine Körpertemperatur zwischen 38,3°C und 40,5°C.

Bei keinem der Pferde konnte ein Ödem festgestellt werden. Ein Pferd hatte eine Thrombozytopenie (28 G/l), eine leichte Leukozytose (13,8 G/l), eine leichte intravaskuläre Hämolyse (fr. Hb 2.34 µmol/l) und Petechien in der Mundschleimhaut.

Die klinischen Untersuchungen legten den Schluss nahe, dass es sich bei diesen Pferden um eine inapparente Form der EIA handelt (HOMMOND et al. 2000). Das Pferd mit der leichten intravaskulären Hämolyse zeigte auch eine Hypoalbuminämie (22,7 g/l). Die ebenfalls bei diesem Tier auffällig erhöhten Enzymaktivitäten der AST (751 U/l), γ -GT (45 U/l) und der GLDH (14,9 U/l), zeigen funktionale Störungen der Leber und des Gallensystems an. Für die erhöhte AST-Aktivität ist nicht allein die Funktionsstörung der Leber verantwortlich, sondern auch die Freisetzung der AST aus den Erythrozyten durch die intravaskuläre Hämolyse.

Die intravaskuläre Hämolyse bei diesem Pferd, könnte durch eine Aktivierung des Komplementsystems, durch die Komplexbildung der Glykoproteine des EIA-Virus und der Oberflächenproteine der Erythrozyten hervorgerufen werden. Diese Antigen-Antikörper-Komplexbindung hat zur Folge, dass die Größe der Erythrozyten zunimmt und somit die Viskosität des Blutes sich erhöht. Durch diese Änderung der Fließeigenschaften werden die feinen Kapillaren in den peripheren Geweben nicht mehr richtig mit Blut versorgt und es kommt zu Organfunktionsstörungen. So wird z. B. die glomeruläre Filtration der Niere gestört (PERRYMAN et al. 1970). Die erhöhten Kreatinin- und Harnstoffkonzentrationen des Patienten im Serum deuten auf eine Glomerulonephritis bzw. auf eine Hypoperfusion der Nieren hin.

Zwei andere Pferde hatten eine normozytäre Anämie ohne intravaskuläre Hämolyse, die durch Suppression der hämopoetischen Progenitorzellen durch das EIA Virus hervorgerufen werden könnte (CHEEVERS u. McGUIRE 1985; SENTSUU u. KONO 1986). Obwohl in der Literatur die intravaskuläre Hämolyse bei Pferden mit einer EIA Infektion beschrieben jedoch nie die fr. Hb-Konzentration im Plasma der Pferde mit EIA gemessen wurde, zeigte nur ein von den vier Pferden mit der inapparenten Form der EIA eine geringgradige intravaskuläre Hämolyse.

3.4 Fr. Hb und equine granulozytäre Ehrlichiose

Equine granulozytäre Ehrlichiose, die heute als equine Anaplasmosen bezeichnet wird, ist eine Krankheit, die durch Zecken übertragen wird. Die Krankheitserreger sind die intrazellulären gramnegativen Rickettsien *Anaplasma phagocytophila* und *Anaplasma equi*. Bei Wiederkäuern ist diese Anaplasmosen verbunden mit einer leichten bzw. mittelschweren hämolytischen Anämie (HORNOK et al. 2007; RIOND et al. 2008). Bei Pferden tritt im Verlauf der Infektion neben der Anämie oft auch ein Ikterus auf (LOEWENICH et al. 2003; FRANZEN et al. 2007). Obwohl dies schon lange bekannt ist, wurde die Ursache der Anämien bei Pferden mit Anaplasmosen nicht untersucht. Wie in den vorangegangenen Kapiteln schon beschrieben, eignet sich die Messung des fr. Hb für die Untersuchung von Anämien, die durch intravaskuläre Hämolyse bedingt werden.

Bei zwei 18-jährigen Stuten mit klinischer Anaplasmosen wurde fr. Hb gemessen, um die intravaskuläre Hämolyse zu untersuchen. Beide Pferde zeigten eine Hyperbilirubinämie und eine Thrombozytopenie. Eines der beiden Pferde hatte sogar eine leichte Anämie mit Petechien im Vestibulum vaginae. Aber die gemessenen Konzentrationen an fr. Hb lagen mit 0,19 $\mu\text{mol/l}$ und 0,26 $\mu\text{mol/l}$ innerhalb des physiologischen Referenzbereiches. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die aufgetretene Anämie nicht durch intravaskuläre Hämolyse ausgelöst worden ist. Dies schließt jedoch eine extravaskuläre Hämolyse oder viszerale Hämorrhagien nicht aus (DUCAN et al. 1994; FRANZEN et al. 2007).

Obwohl eine intravaskuläre Hämolyse nicht festgestellt werden konnte, war die Bilirubinkonzentration im Plasma erhöht. Diese Hyperbilirubinämie kann entweder durch Anorexie oder extravaskuläre Hämolyse verursacht werden (GRONWALL u. MIA 1972; DUCAN et al. 1994).

3.5 Fr. Hb und Hyperbilirubinämie

Wenn die Gesamtbilirubinkonzentration im Serum 75 $\mu\text{mol/l}$ überschreitet, wird ein Ikterus mit gelber Verfärbung der Schleimhäute klinisch sichtbar. Die Ursache für die Hyperbilirubinämie kann prämikrosomale, mikrosomale, oder postmikrosomale Ursachen haben. Dabei wird zwischen dem konjugierten und dem unkonjugierten Bilirubin

unterschieden. Die Konzentration des unkonjugierten Bilirubins steigt bei starkem Hämoglobinabbau, reduzierter Bilirubinaufnahme in der Leberzelle, reduzierte Bilirubinkonjugation, Morbus Gilbert und beim Fasten stark an (LUMSDEN et al. 1991). Eine erhöhte Konzentration des konjugierten Bilirubins im Serum deutet auf ein Zurückfließen des schon konjugierten Bilirubins in das Plasma, aufgrund von Problemen bei der Ausscheidung, Erkrankung des Gallenganges oder auf einen sehr starken Hämoglobinabbau hin (GRONWALL u. MIA 1972).

Das fr. Hb wurde bei einem 14-jährigen Fjordwallach, der eine chronische Hyperbilirubinämie zeigte, gemessen. Sämtliche klinische Untersuchungen ergaben physiologische Befunde. Die Leber stellte sich im Ultraschall ebenfalls physiologisch dar. In den klinisch-chemischen Untersuchungen lagen die Werte der Leberenzyme innerhalb der physiologischen Referenzbereiche. Das Pferd wurde negativ auf equine infektiöse Anämie getestet. Im Blutausstrich konnte weder equine Anaplasmosen noch Babesiose festgestellt werden. Mit dem Coombs-Test wurde das Pferd auf immunmodulierte hämolytische Anämie negativ getestet. Da das Pferd keine Anämie hatte, konnte eine ineffektive Erythropoese als Grund für die Hyperbilirubinämie aufgrund eines Shunt ausgeschlossen werden (HAMER u. FITZGERALD 1973). Das Pferd hatte eine Leistungsdepression, aber die Nahrungsaufnahme war ungestört. Somit schließt sich ein Inanitionsikterus und die damit einhergehende Hyperbilirubinämie aus.

Zu Beginn der Untersuchung lag die Konzentration des fr. Hb mit 1,07 $\mu\text{mol/l}$ im Referenzbereich. Innerhalb von 5 Monaten stieg die Konzentration auf 1,39 $\mu\text{mol/l}$. Da zu diesem Zeitpunkt noch kein Referenzbereich für fr. Hb bei Pferden verfügbar war, wurde die Konzentration des fr. Hb von 10 gesunden Pferden bestimmt. Die Konzentration des fr. Hb lag bei diesen Patienten im physiologischen Bereich. Da die Konzentration des konjugierten Bilirubins im physiologischen Bereich lag, kann die Hyperbilirubinämie nicht postmikrosomalen Ursprungs sein. Erst durch die per orale Applikation von Phenobarbital, das die Glucuronosyltransferase induziert, ließ sich die unkonjugierte Bilirubinkonzentration deutlich absenken und somit könnte ein Mangel der Glucuronosyltransferase bei diesem Patienten die Ursache der kontinuierlichen unkonjugierten Hyperbilirubinämie gewesen sein. Die kontinuierliche unkonjugierte Hyperbilirubinämie dieses Pferdepatienten ähnelt dem Morbus Gilbert beim Menschen. Dieses Syndrom ist eine angeborene Störung des Bilirubinmetabolismus. Der Morbus Gilbert ist durch eine erhöhte kontinuierliche

Konzentration des unkonjugierten Bilirubins bei gleichzeitiger Abwesenheit einer intravaskulären Hämolyse gekennzeichnet (MOUSAVI et al. 2005).

Somit erwies sich die Bestimmung des fr. Hb als ein nützlicher Parameter für die Differentialdiagnose dieser seltenen Krankheit bei Pferden. Durch die physiologische fr. Hb Konzentration konnte eine intravaskuläre Hämolyse ausgeschlossen werden.

4 Zusammenfassung

Win Ohnmar Kyaw

Freies Hämoglobin im Plasma von Pferden

Medizinische Tierklinik der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Eingereicht im September 2008

54 Seiten, 5 Publikationen, 67 Literaturangaben, Anhang

Schlüsselwörter: Pferd, freies Hämoglobin, Strangulationsobstruktion, septische Peritonitis

Einleitung: Um die intravaskuläre Hämolyse bei Pferden zu untersuchen, wurden die Konzentration des freien Hämoglobin (fr. Hb) bei gesunden Pferden, Pferden mit Kolik oder akuter Kolitis, Pferden mit Hyperbilirubinämie, equiner infektiöser Anämie (EIA) und Pferden mit equiner granulozytärer Ehrlichiose (Anaplasmosen) gemessen. Der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF- α) wurde bei Pferden mit Kolik oder Kolitis bestimmt, um Korrelationen zwischen dem fr. Hb und systemischen Entzündungsreaktionen zu finden.

Materialien und Methoden: Für die Bestimmung des fr. Hb in equinem Plasma wurden zwei einfache photometrische Methoden, von HARBOE (HARBOE 1959) und von KAHN (KAHN et al. 1981), miteinander verglichen. Blutproben mit Lithiumheparin wurden von 188 gesunden Pferden unterschiedlichen Geschlechtes und Alters entnommen. Fr. Hb wurde mit der Methode nach KAHN bestimmt. Alle Pferde wurden klinisch untersucht und die hämatologischen und klinisch-chemischen Parameter bestimmt.

Auf der Grundlage des ermittelten Referenzbereiches wurden 36 Pferde, mit Kolik oder Kolitis auf fr. Hb und TNF- α untersucht. Die Blutproben wurden am Tage der Einlieferung in die Klinik genommen.

Bei vier Pferden mit infektiöser Anämie (EIA), zwei 18-jährigen Stuten mit klinischen Zeichen der equinen Anaplasmosen und einem 14-jährigen Wallach mit einer kontinuierlichen unkonjugierten Hyperbilirubinämie wurden das fr. Hb nach oben beschriebener Methodik bestimmt, um die intravaskuläre Hämolyse bei diesen Pferden zu untersuchen.

Ergebnisse: Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit, wurde die Methode nach KAHN für die Bestimmung des fr. Hb bei Pferden eingeführt. Der lineare Bereich dieser Methode lag zwischen 0,21 $\mu\text{mol/l}$ und 105 $\mu\text{mol/l}$. Der ermittelte Referenzbereich für fr. Hb mit dieser Methode bei gesunden adulten Pferden liegt zwischen 0,09 $\mu\text{mol/l}$ und 2,01 $\mu\text{mol/l}$.

Die Konzentrationen des fr. Hb und TNF- α waren bei Pferden mit Strangulation bzw. bei Pferden mit akuter Kolitis oder Peritonitis signifikant höher als bei gesunden Pferden oder Pferden mit nichtstrangulierter Obstruktion. Diese Pferde zeigten ein systemisches inflammatorisches Responssyndrom (SIRS): mit Fieber, Tachykardie, Tachypnoe, Leukopenie, Thrombozytopenie und einer Laktatazidose. Bei den Pferden mit Strangulation und akuten Kolitis mit Peritonitis, die später, aufgrund der Schwere der Magen-Darm-Krankheit, euthanasiert werden mussten, lagen die Konzentrationen von fr. Hb und TNF- α signifikant höher, als bei den geheilten Pferden.

Nur bei einem der vier Pferde mit der inapparenten Form der EIA war die Konzentration des fr. Hb leicht erhöht. Als Begleiterscheinung konnte eine Thrombozytopenie nachgewiesen werden.

Obwohl Thrombozytopenie und Hyperbilirubinämie bei zwei Pferden mit Anaplasiose beobachtet wurde, konnte keine intravaskuläre Hämolyse festgestellt werden. Dies bedeutet, dass die Erythrozytolyse, die in der Literatur für Anaplasiose beschrieben ist, nicht intravaskulär auftritt.

Die Konzentration von fr. Hb bei einem 14-jährigen Wallach mit Hyperbilirubinämie lag innerhalb des physiologischen Referenzbereiches. Aus diesem Grund kann eine intravaskuläre Hämolyse als Ursache für die Hyperbilirubinämie ausgeschlossen werden. Alle weiteren klinischen Befunde und Laborergebnisse der Patienten zeigten Ähnlichkeiten mit dem vererbbaaren Gilbert-Meulengracht-Syndrom des Menschen.

Schlussfolgerungen: Fr. Hb ist ein wichtiger Parameter für die Diagnose der intravaskulären Hämolyse. Die photometrische Methode nach KAHN kann auch für die Messung von fr. Hb in Pferdeplasma eingesetzt werden.

Bei Kolikpferden mit Strangulation oder akuter Kolitis bzw. Peritonitis in Zusammenhang mit SIRS können auch hohe Werte von fr. Hb und TNF- α vorkommen. Wenn die Konzentrationen von TNF- α und fr. Hb stark ansteigen ist die Prognose für eine Heilung schlecht.

Bei Pferden mit der inapparenten Form der EIA zeigte sich, dass die intravaskuläre Hämolyse nur bei 25 % der Patienten auftritt. Weiterhin konnte durch die Messung des fr. Hb nachgewiesen werden, dass die Erythrozytolyse bei Pferden mit Anaplasiose nicht auf eine intravaskuläre Hämolyse zurückzuführen ist. Für die Differentialdiagnostik ist das fr. Hb ein nützlicher Parameter bei der Klärung der Ursachen einer kontinuierlichen unkonjugierten Hyperbilirubinämie.

5 Summary

Win Ohnmar Kyaw

Free Haemoglobin in plasma of horses

Large Animal Clinic for Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted in September 2008

54 pages, 5 publications, 67 references, appendix

Keywords: horse, free haemoglobin, strangulation obstruction, septic peritonitis

Introduction: In order to investigate intravascular haemolysis in horses, plasma free haemoglobin (fr. Hb) concentrations were measured in healthy horses, horses with colic and acute colitis, continuous unconjugated hyperbilirubinaemia, equine infectious anaemia and equine anaplasmosis. Concentrations of serum tumor necrosis factor alpha (TNF- α) were also examined in colic and colitis horses to find out clinical correlates of fr. Hb and systemic inflammatory reaction.

Materials and Methods: For fr. Hb measurement in equine plasma, two spectrophotometric scanning methods of HARBOE (HARBOE 1959) and KAHN (KAHN et al. 1981) from human medicine were compared. Blood samples were taken from 188 healthy horses with different ages and sexes. Fr. Hb was measured by the method of KAHN from lithium-heparinized plasma of all horses with UV/Vis-Spectrophotometer. General clinical examinations, haematological and clinical pathological parameters of all horses were also measured.

Based on this reference range, further determination of fr. Hb and TNF- α in plasma of 36 sick horses with colic or colitis was carried out in the second part of study. Blood samples were taken on the day of admission.

Fr. Hb concentrations were measured in four horses with EIA, two 18-year old mares with clinical signs of anaplasmosis and a 14-year old gelding with chronic continuous unconjugated hyperbilirubinaemia in order to investigate intravascular haemolysis in these horses.

Results: In the first part of the study, it was found that method of KAHN was suitable for equine plasma fr. Hb measurement. The linearity of fr. Hb concentration was from 0.21-105

$\mu\text{mol/l}$. Reference range of fr. Hb in plasma of adult healthy horses is between 0.09 and 2.01 $\mu\text{mol/l}$.

The concentrations of fr. Hb and TNF- α were significantly higher in horses with strangulation or acute colitis with peritonitis than healthy horses and horses with nonstrangulation obstruction. These horses showed systemic inflammatory response syndrome (SIRS): fever, tachycardia, tachypnoe, leucopenia, thrombocytopenia, and lactic acidosis. Concentrations of both fr. Hb and TNF- α were significantly higher in euthanized horses than in completely recovered horses.

Fr. Hb was also measured in different types of diseases for further investigation. The results of the third part of study were as follows.

Plasma fr. Hb concentration was slightly high only in one horse with inapparent form of EIA parallel with thrombocytopenia. Hepatobiliary dysfunction and acute glomerulonephritis were also observed in this horse. Although intravascular haemolysis is described in EIA in literatures, only one out of four horses with EIA was detected with mild intravascular haemolysis.

Although thrombocytopaenia and hyperbilirubinaemia were present in two horses with Anaplasmosis, no evidence of intravascular hemolysis was detected. It can be concluded that erythrocytolysis expressed in literature in equine Anaplasmosis is not intravascular.

Serum fr. Hb concentrations of a horse with consecutive unconjugated hyperbilirubinaemia were within reference range. Therefore, it can be exactly diagnosed that intravascular haemolysis was not the cause of this hyperbilirubinaemia in this horse. All the clinical and laboratory examinations concerning with increased unconjugated bilirubin of these horses were similar to Gilbert-Meulengracht-Syndrome in human, an inherited disease.

Conclusions: Fr. Hb in plasma is a useful parameter for the diagnosis of intravascular haemolysis in horses. Spectrophotometric scanning method of KAHN is suitable to measure fr. Hb in equine plasma. Reference range of fr. Hb in plasma of adult healthy horses is 0.09-2.01 $\mu\text{mol/l}$. High concentrations of fr. Hb and TNF- α were detected in colic horses with strangulation of small intestine or large colon, acute colitis and septic peritonitis with SIRS. Fr. Hb concentrations were directly correlated with TNF- α in these horses and fr. Hb could be a proinflammatory mediator to contribute SIRS. Prognosis was poor in colic or colitis horses if the concentrations of both fr. Hb and TNF- α were high. Intravascular haemolysis cannot be always seen in inapparent form of equine infectious anaemia and erythrocytolysis in equine granulocytic ehrlichiosis is not intravascular. Fr. Hb is also useful for the differential diagnosis of consecutive unconjugated hyperbilirubinaemia in horses.

6 Literaturverzeichnis

Alward A, Corriher AC, Barton MH, Sellon DC, Blikslager AT, Jones SL. Red maple (*Acer rubrum*) leaf toxicosis in horses: A retrospective study of 32 Cases. *J Vet Intern Med.* 2006; 20: 1197-201.

Bardakhch'yan EA, Kharlanova NG. Effect of *E. coli* endotoxin on erythrocyte morphology and blood iron level in rats. *Bull Experim Biol Med.* 1992; 114 (4): 1560-64.

Barton MH, Collatos C. Tumor necrosis factor and interleukin-6 activity and endotoxin concentration in peritoneal fluid and blood of horses with acute abdominal disease. *J Vet Intern Med.* 1999; 13 (5): 45-64.

Bednar R, Bayer PM. Freies Hämoglobin im Plasma - Vergleich zweier spektralphotometrischer Methoden - Bilirubin als Störfaktor. *Lab Med.* 1994; 18: 196-9.

Blakney GB, Dinwoodie AJ. A spectrophotometric scanning technique for the rapid determination of plasma hemoglobin. *Clin Biochem.* 1975; 8: 96-102.

Bone RC. The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med.* 1991; 115 (6): 457- 68.

Bordet C, Chandad F, Grenier D. Hemoglobin and LPS act in synergy to amplify the inflammatory response. *J Dent Res.* 2007; 86: 878-82.

Boulton FE, Huntsman RG. The detection of myoglobin in urine and its distinction from normal and variant haemoglobins. *J Clin Path.* 1971; 24: 816-21.

Buttari B, Profumo E, Petrone L, Pietraforte D, Stracusano A, Margutti P, et al. Free hemoglobin: a dangerous signal for the immune system in patients with carotid atherosclerosis? *Ann N Y Acad Sci.* 2007; 1107 (1): 42-50.

Carrillo EH, Gordon LE, Richardson JD, Polk HC. Free hemoglobin enhances tumor necrosis factor- α production from isolated human monocytes. *J Trauma.* 2001; 52 (3): 449-52.

Cheevers WP, McGuire TC. Equine infectious anemia virus: immunopathogenesis and persistence. Rev Infec Dis. 1985; 7: 83-8.

Claster S, Chio DTY, Quanilha A, Lubin B. Neutrophils mediate lipid peroxidation in human red cells. Blood. 1984; 64: 1079-89.

Coggins L, Norcross NL. Immundiffusion reaction in equine infectious anemia. Cornell Vet. 1970; 60: 330-5.

Davies KJA, Goldberg AL. Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes. J Biol Chem. 1987; 262 (7): 8220-6.

Duncan JR, Prasse KW, Mahaffey EA. Veterinary laboratory medicine – clinical pathology. 3rd ed. Ames: Iowa; 1994.

Flink EB, Watson CJ. A method for the quantitative determination of hemoglobin and related heme pigments in feces, urine, and blood plasma. J Biol Chem. 1942; 146: 171-8.

Frank JJ, Bermes EW, Bickel MJ, Watkins BF. Effect of in vitro hemolysis on chemical values for serum. Clin Chem. 1978; 24: 1966-70.

Franzén P, Berg AL, Aspan A, Gunnarsson A, Pringle J. Death of a horse infected experimentally with *Anaplasma phagocytophilum*. Vet Rec. 2007; 160: 122-5.

Goyette RE, Key NS, Ely ES. Hematologic changes in sepsis and their therapeutic implications. Semin Respir Crit Care Med. 2004; 25 (6): 645-59.

Gronwall R, Mia AS. Fasting hyperbilirubinemia in horses. Dig Dis. 1972;17 (5): 473-76.

Grosche A , Schrödl W, Schusser GF. Specific parameters of blood and peritoneal fluid to indicate the severity of intestinal ischemia in colic horses. Tierärztl Prax. 2006; 34(G): 387-96.

Haga S, Yamamoto N, Nakai-Murakami C, Osawa Y, Tokunaga K, Sata T, et al. Modulation of TNF- α -converting enzyme by the spike protein of SARS-CoV and ACE2 induces TNF-production and facilitates viral entry. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105 (22): 7809-14.

Hamer JW, Fitzgerald PH. Disturbed bone marrow cell proliferation in primary shunt hyperbilirubinemia. *Blood*. 1973; 41: 539-47.

Hammond SA, Li F, McKeon BM, Cook SJ, Issel CJ, Montelaro RC. Immune responses and viral replication in long-term inapparent carriers ponies inoculated with equine infectious anaemia virus. *J Virol*. 2000; 74 (13): 5968-81.

Harboe M. A method for determination of hemoglobin in plasma by near-ultraviolet spectrophotometry. *Scand J Clin Lab Inv*. 1959; 11: 66-70.

Hornok S, Elek V, Fuente J, Naranjo V, Farkas R, Majoros G, et al. First serological and molecular evidence on the endemicity of *Anaplasma ovis* and *A. marginale* in Hungary. *J Vet Mic*. 2007; 122: 316–22.

Issel CJ, Rushlow K, Foil LD, Montelaro RC. A perspective on equine infectious anemia with an emphasis on vector transmission and genetic analysis. *J Vet Mic*. 1988; 17: 251-86.

Jürgens G, Müller M, Brandenburg K. Interaction of hemoglobin with enterobacterial lipopolysaccharide and lipid A - physicochemical characterization and biological activity. *Eur J Biochem*. 2001; 268: 4233-42.

Kaca W, Robert I, Roth RI, Levin J. Hemoglobin, a newly recognized lipopolysaccharide (LPS)-binding protein that enhances LPS biological activity. *J Biol Chem*. 1994; 269 (40): 25078-84.

Kahn SE, Watkins BF, Bermes EW. An evaluation of a spectrophotometric scanning technique for measurement of plasma hemoglobin. *Ann Clin Lab Sci*. 1981; 11: 126-31.

Kato GJ, McGowan V, Machado RB, Little JA, Taylor J, Morris CR, et al. Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease. *Blood*. 2006; 107: 2279-85.

Kraft W. Referenzbereich, Normalbereich, Normbereich, Normalwert. In: Kraft W, Dürr UM. *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*. Stuttgart ,New York: Schattauer; 2005. p. 1–6.

Liese AM, Siddiqi MQ, Siegel JH, Denny T, Spolarics Z. Augmented TNF- α and IL-10 production by primed human monocytes following interaction with oxidatively modified autologous erythrocytes. *J Leukoc Biol*. 2001; 70: 289-96.

Loewenich FD, Stumpf G, Baumgarten BU, Ilinghoff MR, Dumler JS, Bogdan C. A case of equine granulocytic ehrlichiosis provides molecular evidence for the presence of pathogenic *Anaplasma phagocytophilum* (HGE agent) in Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2003; 22: 303–5.

Lumsden JH, Jacobs RM, Physick-Sheard P. Contribution of delta bilirubin to the interpretation of hyperbilirubinemia in the horse a pilot study. *Can Vet J*. 1991; 32: 169-72.

Macka K, Kato JG. Sickle cell disease and nitric oxide: a paradigm shift? *Int J Biochem Cell Biol*. 2006; 38 (8): 1237-43.S

MacKay RJ. Endotoxemia. In: Robinson NE. *Current therapy in equine medicine*. 3rd ed. Philadelphia: WB: Saunders; 1992. p. 225-32.

Maeda K, Hirota M, Kimura Y, Inoue K, Kuwata K, Ohmuraya M, et al. The effect of TNF- α converting enzyme inhibitors on cytokine response in acute pancreatitis. *International Congress Series*. 2003; 1255: 173–5.

Masini AP, Teceschi D, Baragli P, Sighieri C, Lubas G. Exercise-induced intravascular haemolysis in standardbred horses. *Comp Clin Path*. 2003; 12: 45-8.

- McFaul SJ, Bowman PD, Villa VM. Hemoglobin stimulates the release of proinflammatory cytokines from leukocytes from whole blood. *J Lab Clin Med.* 2000; 135: 263-9.
- McGuire TC, Henson JB, Gorham JR. Complement (C3)-coated red blood cells following infection with the virus of equine infectious anaemia. *J Immunol.* 1969; 103: 293-9.
- Minnecci PC, Deans KJ, Zhi H, Yuen PST, Star RA, Banks SM, et al. Hemolysis-associated endothelial dysfunction mediated by accelerated NO inactivation by decompartmentalized oxyhemoglobin. *Clin Invest.* 2005; 115 (12): 3409-17.
- Moore JN. A perspective on endotoxaemia. *AAEP Proceedings.* 2001; 47: 61-74.
- Moore JN, Morris DD. Endotoxemia and septicemia in horses: experimental and clinical correlates. *J Am Vet Med Assoc.* 1992; 200: 1903-14.
- Mousavi S, Malek M, Babaei M. Role of overnight rifampin test in diagnosing Gilbert's syndrome. *Indian J Gastroenterol.* 2005; 24: 108-10.
- Nakajima H, Ushimi C, Fukunaga Y, Hirasawa K. Preparation of equine infectious anemia virus antigen for immunodiffusion test. *Archiv für die gesamte Virusforschung.* 1973; 42: 339-45.
- Nappert G, Johnson PJ. Determination of the acid-base status in 50 horses admitted with colic between December 1998 and May 1999. *Can Vet J.* 2001; 42 (9): 703-7.
- Norman TE, Chaffin MK, Johnson MC, Spangler EA, Weeks BR, Knight R. Intravascular hemolysis associated with severe cutaneous burn injuries in five horses. *J Am Vet Med Assoc.* 2005; 226: 2039-43.
- Oaks JL, Ulibarri C, Crawford TB. Endothelial cell infection in vivo by equine infectious anemia virus. *J Gen Virol.* 1999; 80: 2393-97.
- Oikawa M, Masawa N, Yoshikawa H. Mesenteric arterionecrosis in natural and experimental equine endotoxaemia. *J Comp Path.* 2006; 134: 47-55.

Oikawa M, Yomaoka S. Clinical, haematological, and biochemical analysis of experimental endotoxemia in thoroughbred horses. *J Equine Sci.* 2003; 14 (1): 5-12.

Oski FA. Red cell metabolism in the newborn infant. V. Glycolytic intermediates and glycolytic enzymes. *Pediatrics.* 1969; 44 (1): 84-91.

Perryman LE, McGuire TC, Banks KL, Henson JB. Decreased C3 levels in a chronic virus infection: equine infectious anaemia. *J Immunol.* 1971; 106 (4): 1074-78.

Powell RJ, Machiedo GW, Rush BF, Dikdan G. Oxygen free radicals: effect on red cell deformability in sepsis. *Crit Care Med.* 1991; 19: 732-5.

Ramaiah SK, Harvey JW, Giguère S, Franklin RP, Crawford PC. Intravascular hemolysis associated with liver disease in a horse with marked neutrophil hypersegmentation. *J Vet Intern Med.* 2003; 17: 360-3.

Riond B, Meli ML, Braun U, Deplazes P, Joerger K, Thoma R, et al. Concurrent infections with vector-borne pathogens associated with fatal anaemia in cattle: haematology and blood chemistry. *Comp Clin Pathol.* 2008; 17: 171-7.

Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma haemoglobin. A novel mechanism of human disease. *JAMA.* 2005; 293 (131): 1653-62.

Schaer CA, Vallerian F, Imhof A, Schoedon G, Schaer DJ. CD 163-expressing monocytes constitute an endotoxin-sensitive Hb clearance compartment within the vascular system. *J Leukoc Biol.* 2007; 82: 106-10.

Sentsui H, Kono Y. Complement-mediated hemolysis of horse erythrocytes treated with equine infectious anemia virus. *Arch Virol.* 1987; 95: 53-66.

Solberg EA. Approved recommendation on theory of reference values. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1987; 25(9): 645-56.

Scurie RA. Review: equine infectious anemia: a model of immunoproliferative disease. *Blood*. 1968; 32: 157-69.

Su D, Roth RI, Yoshida M, Levin J. Hemoglobin increases mortality from bacterial endotoxin. *Infect Immun*. 1997; 65 (4): 1258–66.

Suliman HB, Carraway MS, Piantadosi CA. Post lipopolysaccharide oxidative damage of mitochondrial DNA. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003; 167: 570–9.

Swardson CJ, Kociba GJ. Suppression of erythroid progenitors in ponies infected with equine infectious anaemia virus. *Comp Haematol Int*. 1994; 4: 108-13.

Weiss DJ, Moritz A. Equine immune-mediated hemolytic anemia associated with *Clostridium perfringens* infection. *Vet Clin Path*. 2003; 32: 22-6.

Yu B, Raher MJ, Volpato GP, Bloch KD, Ichinose F, Zapol WM. Inhaled nitric oxide enables artificial blood transfusion without hypertension. *Circulation*. 2008; 117: 1982-90.

Zheng Q, Liu Z, Cai R. Determination of myoglobin based on its enzymatic activity by stopped-flow spectrophotometry. *Spectrochim Acta A*. 2005; 61: 1035-8.

Anhang

Vorträge

Seminar zur Vorstellung des Forschungsauftrages für die Dissertation in der Medizinischen Tierklinik der Universität Leipzig, Mai, 2006.

Thema: **Spektralphotometrische Messung des freien Hämoglobins im Plasma von Pferden**

32. Fortbildungsveranstaltung: Labordiagnostik in der Bestandsbetreuung, 22. 6. 2007, Leipzig.

Thema: Freies Hämoglobin bei gesunden und kranken Pferden

Zusammenfassung:

Gegenstand und Ziel: Das Ziel der Arbeit war, die Bestimmung der physiologischen Referenzbereiche des freien Hämoglobins (fr. Hb) im Plasma von gesunden Pferden und die Untersuchung der fr. Hb-Konzentration bei Pferden mit unterschiedlichen Krankheiten.

Material und Methoden: Es wurde heparinisiertes Blutplasma von 188 klinisch gesunden Pferden, 197 kranken Pferden der Med. Tierklinik und von 9 Pferden der Ehrlichiosesurveillance unterschiedlichen Geschlechts und Alters auf fr. Hb mittels UV/Vis-Spektralphotometer, Beckman-Coulter DU 640 B, unter Verwendung von Halbmikro-Einmalküvetten untersucht. Eine sorgfältige Punktion der *V. jugularis ext.* und seitliches Hineinfließen in ein Lithiumheparinröhrchen verhindert die iatrogene Hämolyse. Die gewonnenen heparinisierten Blutproben müssen nach der Entnahme 30 Minuten bei Zimmertemperatur stehen. Der Plasmaüberstand wird danach 5 Minuten bei 1100 g zentrifugiert. Die fr. Hb-Konzentration im Plasma wurde nach der Methode nach KAHN gemessen.

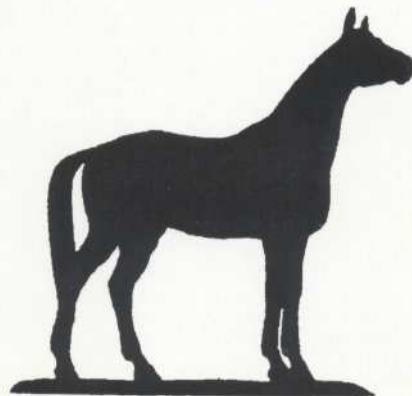
Ergebnisse: Der Referenzbereich für fr. Hb im Plasma adulter, gesunder Pferde liegt zwischen 0,09 und 2,01 $\mu\text{mol/l}$ (95 % Konfidenzintervall) bei einem Median von 0,80 $\mu\text{mol/l}$. 9 Pferde mit positivem Antiköpertiter für Equine Granulozytäre Ehrlichiose hatten im Verlauf von 6 Monaten eine fr. Hb-Konzentration im physiologischen Bereich. Kranke Pferde (31/197) hatten eine intravaskuläre Hämolyse. Es gab keine Hämoglobinurie bis zu einer fr. Hb-Konzentration von 20,55 $\mu\text{mol/l}$ im Plasma. Erythrozyten, Gesamt-Hb, Protein und Albumin bei den untersuchten 31 Pferden waren nicht signifikant verändert. Indirektes Bilirubin, Glukose, LDH, CK und Lactat waren erhöht bei erhöhter Konzentration an freien Hb im Plasma. 23 der 31 Pferde mit erhöhtem fr. Hb waren Kolikpatienten mit intravaskulärer Hämolyse und Sepsis (17/23).

Schlussfolgerung und klinische Relevanz: Die Bestimmung des fr. Hb ist ein Parameter für die Diagnose intravaskulärer Hämolyse. Zwei Drittel der Kolikpferde wiesen eine höhere Konzentration an fr. Hb auf, die wohl auf eine Endotoxämie zurückzuführen sei. Erhöhtes fr. Hb wirkt proinflammatorisch.

20. Arbeitstagung der Fachgruppe Pferdekrankheiten, Niedersachsenhalle im Hannover-Congress-Zentrum 29. Februar - 01. März 2008.

Thema: **Freies Hämoglobin bei gesunden und kolikkranken Pferde**

DEUTSCHE
VETERINÄRMEDIZINISCHE
GESELLSCHAFT E.V.



20. Arbeitstagung der Fachgruppe
„Pferdekrankheiten“

Niedersachsenhalle
im Hannover-Congress-Centrum
29. Februar und 1. März 2008

Zusammenfassung:

Einleitung: Freies Hämoglobin adhäriert an den Endothelien der Kapillaren insbesondere im Glomerulum der Niere und in den Kapillaren des Herzmuskels (1,2). Das Ziel der Arbeit war die Bestimmung der physiologischen Referenzbereiche des freien Hämoglobins (fr. Hb) im Plasma von gesunden Pferden und die Untersuchung der fr. Hb-Konzentration bei Pferden mit unterschiedlichen Krankheiten.

Material und Methoden: Es wurde heparinisiertes Blutplasma von 188 klinisch gesunden Pferden, 197 kranken Pferden der Med. Tierklinik und von 9 Pferden der Ehrlichiosesurveillance unterschiedlichen Geschlechts und Alters auf fr. Hb mittels UV/Vis-Spektralphotometer, Beckman-Coulter DU 640 B, unter Verwendung von Halbmikro-Einmalküvetten untersucht. Eine sorgfältige Punktion der *V. jugularis ext.* und seitliches Hineinfließen in ein Lithiumheparinröhrchen verhindert die iatrogene Hämolyse. Die gewonnenen heparinisierten Blutproben müssen nach der Entnahme 30 Minuten bei Zimmertemperatur stehen. Der Plasmaüberstand wird danach 5 Minuten bei 1100 g zentrifugiert. Die fr. Hb-Konzentration im Plasma wurde nach der Methode nach KAHN (4) gemessen. Die Referenzwertberechnung erfolgte mittels Berechnung des Medianwertes und des 95 % Konfidenzintervalles.

Ergebnisse: Der Referenzbereich für fr. Hb im Plasma adulter, gesunder Pferde liegt zwischen 0,09 und 2,01 $\mu\text{mol/l}$ (95 % Konfidenzintervall) bei einem Median von 0,80 $\mu\text{mol/l}$. Neun Pferde mit positivem Antiköpertiter für Equine Granulozytäre Ehrlichiose hatten im Verlauf von 6 Monaten eine fr. Hb-Konzentration im physiologischen Bereich. 28/95 Kolikpferden hatten erhöhtes fr. Hb. Es gab keine Hämoglobinurie bis zu einer fr. Hb-Konzentration von 20,55 $\mu\text{mol/l}$ im Plasma. Erythrozyten, Gesamt-Hb, Protein und Albumin bei den 28 Kolikpferden waren nicht signifikant verändert, jedoch indirektes Bilirubin, Glukose, LDH, CK und Lactat waren erhöht. Die 28 Kolikpferde mit erhöhtem fr. Hb zeigten auch septische Symptome.

Schlussfolgerung: Die Bestimmung des fr. Hb ist ein Parameter für die Diagnose intravaskulärer Hämolyse 26,6% der Kolikpferde wiesen eine höhere Konzentration an fr. Hb auf, die wohl auf eine Endotoxämie zurückzuführen sei. Erhöhtes fr. Hb wirkt proinflammatorisch(3,5).

Literatur

1. Bednar R, Bayer PM. Freies Hämoglobin im Plasma - Vergleich zweier spektralphotometrischer Methoden - Bilirubin als Störfaktor. *Lab Med* 1994; 18: 196-9.
2. Blakney GB, Dinwoodie AJ. A spectrophotometric scanning technique for the rapid determination of plasma hemoglobin. *Clin Biochem* 1975; 8: 96-102.
3. Gudrun Jürgens, Mareike Müller, Michel H. J. Koch and Klaus Brandenburg. Interaction of hemoglobin with enterobacterial lipopolysaccharide and lipid A. *Eur. J. Biochem* 2001; 268, 4233-4242.
4. Kahn SE, Watkins BF, Bermes EW. An evaluation of a spectrophotometric scanning technique for measurement of plasma hemoglobin. *Ann Clin Lab Sci* 1981; 11: 126-31.
5. William C. Aird, MD. The hematologic system as a marker of organ dysfunction in sepsis. *Mayo Clin Proc*, July 2003, Vol 78.

Erstes Absolventenseminar von Stipendiendaten aus Süd- und Südostasien des DAAD in April, Bonn.

Thema: **Freies Hämoglobin bei gesunden und kranken Pferden**



Bilanz und Qualitätskontrolle

Seminar für Absolventen

Nachhaltige Bindung: Bevor Stipendiaten aus Süd- und Südostasien Deutschland wieder verlassen, informierte sie der DAAD Anfang April über Alumni-Netzwerke in ihren Heimatländern.

„In Deutschland sind die Pferde zweimal so groß wie in meiner Heimat Myanmar“, lacht Ohnmar Kyaw Win und streckt ihren rechten Arm in die Höhe. „Das macht schon einen Unterschied, wenn man plötzlich so ein großes Tier halten muss.“ Ihre Zuneigung zu Tieren ist der Grund für das Studium der Veterinärmedizin. „Wenn ein Tier krank ist, kann es nicht sagen, was ihm fehlt oder wo es ihm wehtut. Das ist in der Tiermedizin die besondere Herausforderung“, sagt die Doktorandin an der Universität Leipzig. Die Medizinische Tierklinik unter Leitung von Professor Gerald Fritz Schusser war ausschlaggebend für die DAAD-Stipendiatin, nach Leipzig zu gehen. „Die Arbeit in einer Klinik ist in meinem Fachgebiet immens wichtig“, erzählt Ohnmar Kyaw Win. „Diese Möglichkeit hätte ich in Myanmar nicht gehabt.“ Nach Abschluss ihrer Doktorarbeit wird die Tierärztin in ihre Heimat zurückkehren und die Kontakte zur deutschen Universität für ihre wissenschaftliche Tätigkeit nutzen.



Das Fazit der Stipendiaten: „Doing research in Germany meant discovering myself.“

© DAAD

Deutschlanderfahrung multiplizieren

Gemeinsam mit rund 45 Stipendiatinnen und Stipendiaten aus Süd- und Südostasien traf sich Ohnmar Kyaw Win zum ersten Absolventenseminar des DAAD in Bonn. „Das war die Premiere für ein neues Element in der Stipendiatenbetreuung“, sagt DAAD-Referatsleiterin Hannelore Bossmann. Sie erinnerte die Studierenden an die Verantwortung, die mit dem Stipendium verbunden sei. Der DAAD wünsche sich von den jungen Wissenschaftlern, dass sie mit ihrer Deutschlanderfahrung als Multiplikatoren in ihren Heimatländern wirken, sei es in der Wissenschaft oder in der Wirtschaft.

Mit dem Absolventenseminar will der DAAD die Kontakte zu seinen Stipendiaten kurz vor Abschluss der Förderung noch einmal festigen und mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Alexander von Humboldt-Stiftung die vielen Möglichkeiten zur weiteren Kooperation mit Deutschland aufzeigen. Denn überall bieten sich Chancen, mit Deutschland und dem DAAD in Verbindung zu



Stichwort Deutschland: Stipendiaten sammeln Erfahrungen und Eindrücke

bleiben: Allein in Indonesien engagieren sich sieben Alumni-Vereine. Im August findet dort ein Alumni-Seminar zum Thema „Wassermanagement“ statt.

In Bonn stellten die Stipendiatinnen und Stipendiaten ihre Dissertationen vor und zogen Bilanz. Die fiel durchweg positiv aus: Ihre Zeit in Deutschland brachte nicht nur die wissenschaftliche Arbeit voran, sondern förderte auch ihre persönliche Entwicklung – beides Pluspunkte für die weitere Karriere. „Doing research in Germany meant discovering myself“, lautete das Fazit der Gruppe. „Die Rückmeldungen sind wichtige Hinweise für die Qualitätskontrolle unserer Förderinstrumente“, erklärt Hannelore Bossmann.

© DAAD

Kooperation zwischen Kassel und Phnom Penh

Die Bandbreite der vorgestellten Dissertationen reichte von Malariabekämpfung über Darmkrebsprävention bis Straßenbau in Indonesien. Mit Ökotourismus befasst sich Baromey Neth aus Kambodscha an der Universität Kassel. Er promoviert im Fachgebiet für Entwicklungspolitik, Migration und Agrarpolitik und engagiert sich für eine Kooperation zwischen Kassel und seiner Heimatuniversität in Phnom Penh sowie für Forschungsprojekte mit Nachbarländern wie Thailand. Baromey Neth knüpft regionale Netzwerke und ist damit ein gutes Beispiel für das zweite große Thema des Absolventenseminars. Denn bei dem Treffen in Bonn sollten sich die Nachwuchsakademiker auch untereinander besser kennenlernen und so den Grundstein für länderübergreifende Kooperationen legen. Nach der Rückkehr an ihre Schreibtische im Heimatland wird sie eine DAAD-Tasse mit dem Bild aller Seminar-Teilnehmer daran erinnern.

Autorin: Claudia Wallendorf

Veröffentlichungsdatum: 14.04.2008

DAAD Deutscher Akademischer Austausch Dienst
German Academic Exchange Service

© DAAD

→ FENSTER SCHLIESSEN

33. Fortbildungsveranstaltung: Labordiagnostik in der Bestandsbetreuung, 6. 6. 2008,
Leipzig.

Thema: **Intravaskuläre Hämolyse und TNF- α bei Kolikpferden**

Zusammenfassung:

Gegenstand und Ziel:

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Verhalten der Konzentrationen an fr. Hb und TNF- α bei Pferden mit Kolik oder akuter Kolitis zu untersuchen und Zusammenhänge aufzuzeigen.

Material und Methode:

50 Pferde wurden aufgrund der klinischen und labormedizinischen Untersuchungsbefunde in 4 Gruppen eingeteilt: Gruppe 1 (n=14) gesunde Pferde, Gruppe 2 (n=13) Pferde mit nichtstrangulierter Obstruktion (Verlagerung oder Opstipation des großen Kolons), Gruppe 3 (n=11) Pferde mit Strangulation (Dünndarm oder Dickdarm) und Gruppe 4 (n=12) Pferde mit akuter Kolitis und schwerer Entzündung (Peritonitis oder Thrombophlebitis). Bei allen Pferden wurde fr. Hb mit der Methode nach Kahn bestimmt und TNF- α mit dem Duo Set ELISA Development Kit für Equine TNF- α Messung gemessen.

Ergebnisse:

Klinische Parameter, wie Fieber oder erniedrigte Temperatur, Tachypnoe und Tachykardie, verminderte Hautelastizität, gerötete Schleimhäute, kalte Akren, Thrombozytopenie, Leukopenie ($<4,1$ G/l), Leukozytose (>13 G/l) oder Linkverschiebung (>10 % stabkernige neutrophile Granulozyten) waren Symptome von SIRS in den Gruppen 3 und 4.

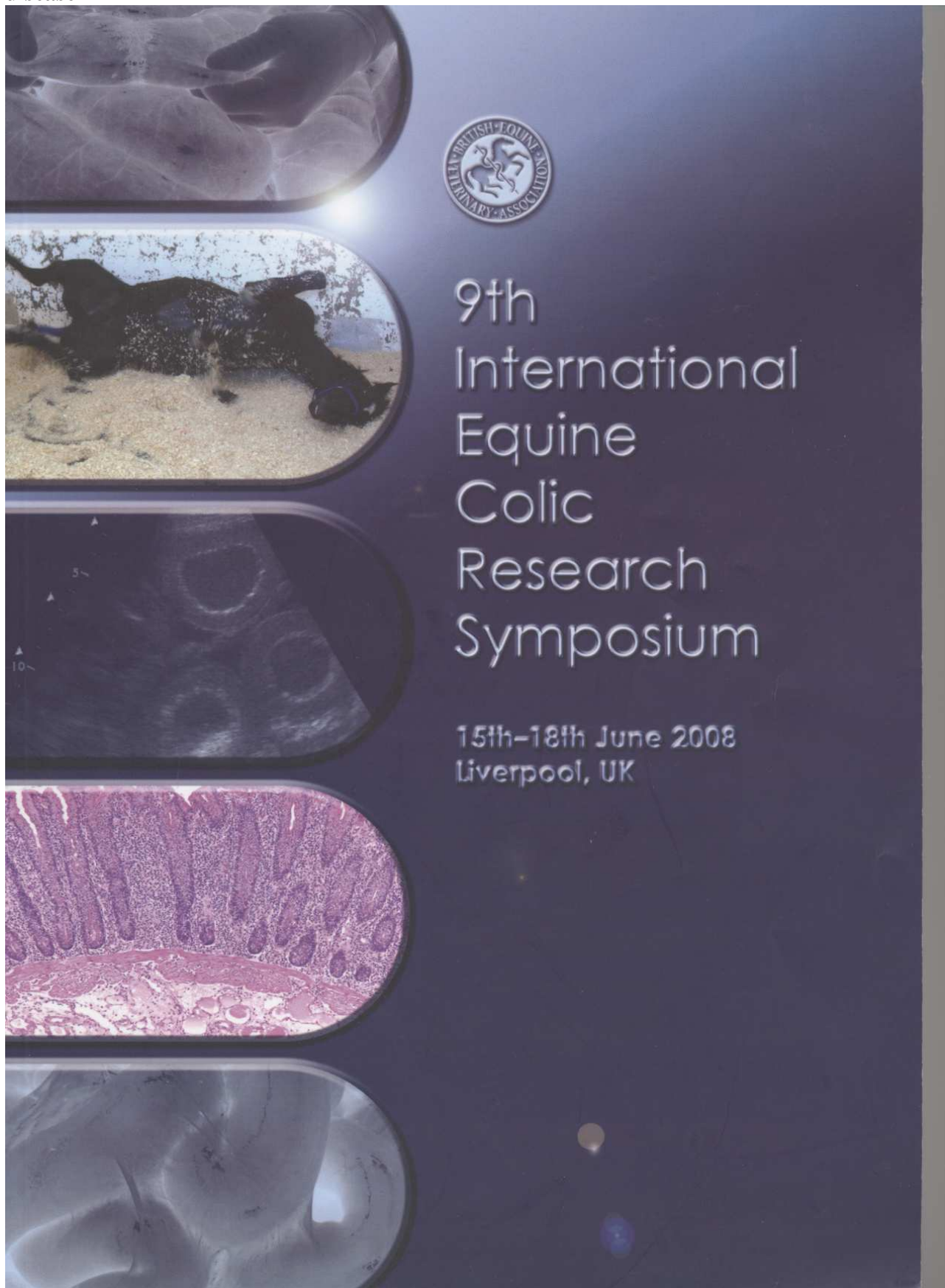
Zwischen den Gruppen 1 und 2 konnten keine Unterschiede von fr. Hb und TNF- α festgestellt werden. Bei Pferden der Gruppe 3 (Median: $8,0 \mu\text{mol/l}$; 14665 pg/ml) und 4 ($9,1$; 15081) wurden dagegen signifikant höhere Konzentrationen von fr. Hb und TNF- α im Vergleich zu den Pferden der Gruppe 1 ($0,61$; 573) und 2 ($0,5$; 821). Weiterhin besteht eine positive gesicherte Korrelation ($r=0.82$, $P=0.01$) zwischen der Konzentration an fr. Hb und TNF- α in Gruppe 4. Die Konzentrationen von fr. Hb und TNF- α sind signifikant höher ($p<0,01$) in euthanasierten als in konservative behandelten und geheilten Patienten.

Schlussfolgerungen:

Aufgrund der oben angeführten klinischen und labormedizinischen Befunde bei Pferden mit Strangulationsileus oder akuter Kolitis könnten die gefundenen signifikant höheren Konzentrationen von fr. Hb und TNF- α zur systemischen Entzündung (SIRS) beitragen und somit eine schlechte Prognose für diese Pferde herbeiführen.

The Ninth International Equine Colic Research Symposium, 15th – 18th June 2008 in Liverpool.

Topic: **Free Haemoglobin and TNF- α in blood of horses with acute abdominal disease**



Immunology/Pharmacology



16.00–16.20

FREE HAEMOGLOBIN AND TUMOUR NECROSIS FACTOR-ALPHA IN BLOOD OF HORSES WITH ACUTE ABDOMINAL DISEASE

W. Ohnmar Kyaw, A. Uhlig and G.F. Schusser

Department of Large Animal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, Germany.

Background

Physiological reference range of free haemoglobin (Hb) in plasma of adult horses is 0.09–2.01 $\mu\text{mol/l}$ (Ohnmar Kyaw *et al.* 2007) and high concentration of free Hb is released in blood based on pathological intravascular haemolysis (Schäfer *et al.* 2007). Tumour necrosis factor- α (TNF- α) is a proinflammatory endogenous mediator that can contribute to the pathogenesis of endotoxaemia, one of the most characterised components of equine colic (Moore and Morris 1992; Barton and Collatos 1999). Free Hb enhances production of TNF- α from monocytes during endotoxaemia contributing to systemic inflammatory response syndrome (SIRS) (Jürgens *et al.* 2001).

Objectives

This study was aimed: (1) to investigate the concentrations of free Hb and TNF- α in blood of horses with acute abdominal disease, and (2) to examine clinical correlation of free Hb and TNF- α in these patients.

Methods

A total of 50 adult horses admitted to veterinary hospital, University of Leipzig were classified into 4 groups: normal horses (group 1, $n = 14$), horses with non-strangulation obstruction (group 2, $n = 13$), horses with strangulation obstruction (group 3, $n = 11$) and horses with severe inflammatory process (peritonitis, colitis and thrombophlebitis) (group 4, $n = 12$). Free Hb was measured by the method of Kahn *et al.* (1994) using a UV/vis-spectral photometer (DU 640 B, Beckman-Coulter GmbH, Germany), complete blood count by haematological counter ADVIA 120, serum clinical chemistry by Hitachi 912 automatic analyser, TNF- α with Duo Set ELISA development kit for equine TNF- α assay (R&D system USA) were measured at Central Laboratories, University of Leipzig. Mann-Whitney Test for the comparison of groups and test of Pearson for correlation of variables were used with statistic program SPSS 14.0 in this experiment and significance was taken at a level of $P < 0.05$.

Results

Concentrations of free Hb in plasma ($\mu\text{mol/l}$) and serum TNF- α (pg/ml) were 0.61, 0.5, 8.0 and 9.1, and 573.8, 821.6, 14 665.0 and 15 081.5 in groups 1, 2, 3 and 4 respectively. Free Hb and TNF- α were significantly higher ($P < 0.01$) in groups 3 and 4 in comparison to normal horses (group 1) whereas group 2 showed no significant difference from group 1. There was correlation between free Hb and TNF- α ($r = 0.82$, $p = 0.01$) in group 4. From horses with high levels of free Hb, 5/11 from group 3, 3/12 from group 4 needed surgical treatment, 3/11 from group 3 and 5/12 from group 4 were subjected to euthanasia because of endotoxaemic shock and 3/11 from group 3

and 4/12 from group 4 gained complete recovery. All horses with normal free Hb level (group 2) recovered and were discharged from the hospital.

Conclusions

Increased levels of free Hb and TNF- α were detected in blood of colic horses with strangulation obstruction and in cases with severe inflammation. Based on our results high intravascular free Hb could increase the production of TNF- α as a proinflammatory mediator.

References

- Barton, M.H. and Collatos, C. (1999) Tumor necrosis factor and Interleukin-6 activity and endotoxin concentration in peritoneal fluid and blood of horses with acute abdominal disease. *J. vet. int. Med.* **13**, 457-464.
- Jürgens, G., Müller, M., Koch, M.H.J. and Brandenburg, K. (2001) Interaction of hemoglobin with enterobacterial lipopolysaccharide and lipid A. *Eur. J. Biochem.* **268**, 4233-4242.
- Kahn, S.E., Watkins, B.F. and Bermes, E.W. (1994) An evaluation of a spectrophotometric scanning technique for measurement of plasma hemoglobin. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **11**, 126-131.
- Moore, J.N. and Morris, D.D. (1992) Endotoxemia and septicemia in horses: experimental and clinical correlates. *J. Am. vet. med. Ass.* **200**, 1903-1914.
- Ohnmar Kyaw, W., Uhlig, A., Gräse, A., Wittek, T., Meister, A. and Schusser, G.F. (2007) Spektralphotometrische Bestimmung des freien Hämoglobins im Plasma von gesunden Pferden. *Tierärztl. Prax.* **35**, 432-438.
- Schaer, C.A., Vallelian, F., Imhof, A., Schoedon, G. and Schaer, D.J. (2007) CD 163-expressing monocytes constitute an endotoxin-sensitive Hb clearance compartment within the vascular system. *J. Leukocyte Biol.* **82**, 107-110.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Schusser danke ich herzlich, für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas und die allzeit gewährte Unterstützung bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit.

Weiterhin danke ich Frau Dr. Grosche, die mir eine große Probenanzahl zur Analyse zur Verfügung stellte.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Dr. Uhlig und Dr. Meister, die mich sprachlich und wissenschaftlich förderten.

Bedanken möchte ich mich bei Frau Heger, Frau Ruhland, Frau Näther Frau Heun und Frau Conrad, die mich ausführlich in die Laborarbeit einwiesen und mich jederzeit bei meiner Arbeit unterstützten, sowie für die zuverlässige Untersuchung der klinisch- chemischen Parameter am Hitachi.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Sack und Frau Bauer für die TNF- α Messung.

Große Unterstützung erhielt ich von Herrn Richter und Dr. Wittek, die die statistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse vornahmen.

Mein ganz besonderer Dank geht an Herrn Dr. Köller, der mir sehr großzügig seine Zeit, im Besonderen viele Stunden seiner Freizeit, für die Fertigstellung meiner Arbeit widmete.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Frau Golchert für ihre administrative Hilfe.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Tierärzten, Tierarzhelfern und Tierpflegern der Medizinischen Tierklinik für die Zusammenarbeit in der Klinik bedanken.

Der größte Dank für seelische und moralische Unterstützung gilt meinen Eltern, U Sein Kyaw und Daw Mya Win Kyi, meinem Mann, Dr. Kyaw San Lin, und meinem Sohn, Aung Khine Lin, ohne die ein so langer Auslandsaufenthalt und der Abschluss dieser Arbeit niemals möglich gewesen wäre.

Danksagung

Abschließend möchte ich mich ganz herzlich noch beim DAAD, sowie bei Frau Burbach und Frau Klimmerk bedanken, die mir durch den Dschungel von Anträgen und Formularen halfen und so einen unkomplizierten Aufenthalt möglich machten.